

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA**



**Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali**  
**Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Molecolari e**  
**Industriali**

**Tesi di Laurea**

**MODULAZIONE DELLA SECREZIONE DI GLP-1 E**  
**FUNZIONALITA' ALFA-CELLULARE PANCREATICA:**  
**EFFETTO DELL'IPERGLICEMIA, IPERNEFEMIA E**  
**IPERGLUCAGONEMIA**

***Relatori:***

*Prof. Stefano DEL PRATO*

*Dott. Roberto LUPI*

***Candidato:***

*Valentina Garau*

*Anno Accademico 2013/2014*

*Alla mia famiglia e  
a te che da 8 anni ne fai parte...*

“You may say I’m a dreamer  
But I’m not the only one  
I hope someday you’ll join us  
And the world will be as one.”

John Lennon, Imagine.

## **Riassunto**

Il diabete mellito è una sindrome eterogenea, comprendente varie forme cliniche, di cui le più frequenti sono il diabete tipo 1, caratterizzato da deficit più o meno totale di secrezione di insulina, dovuto alla distruzione autoimmune delle cellule beta delle isole di Langerhans, e, soprattutto, il diabete tipo 2, in cui sono presenti, oltre alla carenza di insulina, fenomeni di resistenza all'azione dell'ormone. In questi ultimi anni sono stati fatti notevoli progressi nello studio e nella valutazione funzionale delle isole pancreatiche, che costituiscono non più dell'1-2% della massa pancreatica complessiva. Sono strutture che contengono vari tipi di cellule endocrine, di cui le più rappresentate sono le cellule beta produttrici di insulina (60-80%) e le cellule alfa produttrici di glucagone (20-30%). In questi ultimi anni i ricercatori hanno focalizzato la propria attenzione principalmente sullo studio delle cellule beta pancreatiche, andando a studiarne i meccanismi che regolano la sintesi e il rilascio dell'insulina, nonché la massa complessiva delle cellule stesse. Tuttavia, in letteratura sono presenti pochi studi riguardo al ruolo delle cellule alfa nella funzionalità insulinare. Le cellule alfa sintetizzano e rilasciano il glucagone. Tale ormone è il risultato finale di una serie di modifiche a carico del proglucagone, che rappresenta il reale polipeptide derivante dalla trascrizione del gene corrispondente. L'azione di enzimi proteolitici con specificità tissutale porta, infatti, attraverso clivaggi successivi, dal proglucagone al glucagone nelle cellule alfa e al Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) e Glucagon-like peptide 2 (GLP-2) nelle cellule L dell'intestino. Recentemente è stato condotto uno studio nel nostro laboratorio in cui è stata valutata la secrezione e la funzione del GLP-1 in una linea cellulare di alfa cellule murine esposte o meno a perturbazioni metaboliche tipiche del diabete mellito tipo 2, i cui risultati preliminari sembrano indicare che l'iperglicemia potrebbe indurre nelle alfa cellule pancreatiche un incremento dell'espressione dell'enzima PC1/3 con aumento della secrezione di GLP-1 nella sua forma totale ed, in particolare, in quella attiva. Questo potrebbe avere un effetto protettivo sulle alfa cellule stesse, mediato da un aumento della concentrazione di GLP-1 attivo nel terreno di coltura in cellule esposte ad elevato glucosio, associato ad una

riduzione della necrosi, un aumento dell'attività metabolica ed un aumento della funzionalità cellulare.

## **Abstract**

Diabetes mellitus is a clinically and genetically heterogeneous groups of metabolic disorders characterized by abnormally high levels of glucose in the blood. These groups distinguished two major forms, which they termed insulin-dependent (type 1) and non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. Type 1 is characterized by a total deficiency of insulin secretion due to autoimmune destruction of the beta cells of the islets of Langerhans; type 2 is characterized by an insulin deficient associated to phenomena of peripheral resistance to the action of the hormone. There have been significant advances in the study and functional assessment of the pancreatic islets, which constitute no more than 1-2% of the total pancreatic mass. They are structures that contain various types of endocrine cells, of which the most represented are the insulin-producing beta cells (60-80%) and the glucagon-producing alpha cells (20-30%). In recent years, researchers have focused their attention mainly on the beta cells, studying the mechanisms that regulate synthesis and release of insulin, as well as the total mass of the cells themselves. However, in the literature there are scanty studies about the role of alpha cells in the functionality of the islets. Alpha cells synthesize and release glucagon. This hormone is the final result of a series of changes in the load of the proglucagon, which represents the real polypeptide resulting from transcription of the corresponding gene. The action of proteolytic enzymes tissue-specific that leads, through subsequent cleavage, from proglucagon to glucagon in alpha cells and glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and glucagon-like peptide 2 (GLP-2 ) in intestinal L cells. Recently, in our laboratory was performed a study to assess the secretion and function of GLP-1 in a cell line of murine alpha cells, exposed or not to metabolic perturbations typical of type 2 diabetes mellitus: the preliminary results seem to indicate that hyperglycemia could induce an increased expression of the enzyme PC1/3 paralleled to an augmentation in the secretion of GLP-1 in its total form and, in particular, into the active one. This could have a protective effect, mediated by an increase in the concentration of active GLP-1 form in the culture medium of the cells exposed to high glucose, associated with a reduction of necrosis, an increase in metabolic activity and an increase of cell function.

## Sommario

<b>CAPITOLO 1. INTRODUZIONE</b>	<b>- 8 -</b>
1.1 CENNI SUL DIABETE MELLITO	- 11 -
1.2 IL DIABETE MELLITO DI TIPO 2	- 12 -
1.3 STRUTTURA DEL PANCREAS	- 13 -
1.4 DIABETE DI TIPO 2 E CELLULE BETA PANCREATICHE	- 16 -
1.5 DIABETE DI TIPO 2 E CELLULE ALFA PANCREATICHE	- 18 -
1.6 INSULINO-RESISTENZA, GLUCOTOSSICITÀ E LIPOTOSSICITÀ	- 19 -
1.7 LE INCRETINE	- 21 -
1.8 DIABETE DI TIPO 2 E IPERGLUCAGONEMIA	- 26 -
1.9 DIABETE DI TIPO 2 E IL-6	- 39 -
 <b>CAPITOLO 2. SCOPO DELLA TESI</b>	 <b>- 47 -</b>
 <b>CAPITOLO 3. MATERIALI E METODI</b>	 <b>- 48 -</b>
3.1 LINEA CELLULARE ALFA-TC1 CLONE 6	- 48 -
3.2 COLTURA CELLULARE	- 48 -
3.2.1 <i>Subcoltura delle cellule</i>	- 48 -
3.2.2 <i>Tripsinizzazione cellulare per studi sperimentali</i>	- 49 -
3.2.3 <i>Conta cellulare</i>	- 49 -
3.2.4 <i>Disegno sperimentale</i>	- 50 -
3.3 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ METABOLICA CELLULARE	- 51 -
3.4 VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI E DELLA NECROSI CELLULARE	- 52 -
3.5 VALUTAZIONE DELLO STRESS OSSIDATIVO CELLULARE	- 54 -
3.6 ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE	- 55 -
3.7 RETROTRASCRIZIONE DELL'RNA TOTALE	- 57 -
3.8 PCR REAL-TIME	- 58 -
3.9 DOSAGGIO PROTEICO CON METODO BRADFORD	- 64 -
3.10 WESTERN BLOT	- 66 -
3.11 VALUTAZIONE DELLA SECREZIONE DI GLP-1 TOTALE CON METODO ELISA	- 70 -
3.12 VALUTAZIONE DELLA SECREZIONE DI GLP-1 ATTIVO CON METODO ELISA	- 71 -
3.13 VALUTAZIONE DELLA SECREZIONE DI GLUCAGONE CON METODO ELISA	- 73 -
3.14 ANALISI STATISTICA	- 74 -

<b>CAPITOLO 4. RISULTATI</b>	<b>- 76 -</b>
4.1 CARATTERISTICHE DELLA LINEA CELLULARE STUDIATA	- 76 -
4.2 RISULTATI 1. STUDIO DEL GLP-1 IN ALFA-CELLULE PANCREATICHE MURINE (ALFA-TC1 CLONE 6) ESPOSTE AD ALTO GLUCOSIO.	- 77 -
4.2.1 <i>Attività metabolica cellulare</i>	- 77 -
4.2.2 <i>Valutazione del GLP-1 totale, attivo e rapporto attivo/totale in cellule alfa-TC1 clone 6 esposte a glucosio 16.7 mmol/l</i>	- 78 -
4.3 RISULTATI 2. STUDIO DEL GLP-1 IN ALFA-CELLULE PANCREATICHE MURINE (ALFA-TC1 CLONE 6) ESPOSTE A GLUCAGONE, FFA E IL-6	- 80 -
4.3.1 <i>Attività metabolica cellulare</i>	- 80 -
4.3.2 <i>Valutazione del tasso di apoptosi e necrosi cellulare</i>	- 81 -
4.3.3 <i>Valutazione dello stress ossidativo</i>	- 82 -
4.3.4 <i>Studi di espressione genica</i>	- 83 -
4.3.5 <i>Studi di espressione proteica</i>	- 85 -
4.3.6 <i>Studi funzionali</i>	- 87 -

<b>CAPITOLO 5. DISCUSSIONE DEI RISULTATI</b>	<b>- 91 -</b>
--	---------------

## Capitolo 1. Introduzione

Il diabete mellito è una patologia cronica che si manifesta con un'instabilità persistente dei livelli glicemici ematici e comprende varie forme cliniche di cui, le più frequenti, sono il diabete di tipo 1, caratterizzato da deficit più o meno totale di secrezione di insulina per distruzione autoimmune delle cellule beta-pancreatiche e il diabete di tipo 2, caratterizzato da insulino-resistenza periferica che porta nel tempo a deficit secretorio dell'ormone<sup>1,2,3,4,5,6</sup>. L'organo colpito è il pancreas, in particolare la sua parte endocrina, le isole di Langerhans, che costituiscono non più dell'1-2% della massa pancreatica complessiva e sono popolate da cellule beta produttrici di insulina (60-80%), alfa secernenti glucagone (20-30%) e delta che rilasciano somatostatina (1-2%). In questi ultimi anni i ricercatori hanno focalizzato l'attenzione principalmente sullo studio delle cellule beta pancreatiche, andando a studiarne sia la funzionalità (sintesi e secrezione dell'insulina) che la vitalità cellulare, tuttavia in letteratura sono presenti pochi studi riguardo al ruolo delle alfa cellule nella fisiopatologia insulare. Le cellule alfa pancreatiche sintetizzano e rilasciano glucagone a partire da pro-glucagone, mentre, dallo stesso precursore, nelle cellule L dell'intestino sono prodotti Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) e Glucagon-like peptide 2 (GLP-2), ciò accade grazie all'azione di enzimi proteolitici aventi specificità tissutale: l'enzima pro-ormone convertasi 2 (PC2) presente maggiormente nelle cellule alfa e l'enzima pro-ormone convertasi 1/3 (PC1/3) predominante nelle cellule L intestinali<sup>7,8,9</sup>.

---

<sup>1</sup>Brunton S. Beyond glycemic control: treating the entire type 2 diabetes disorder. *Postgrad Med.*, 121(5):68{81, 2009.

<sup>2</sup>Lau DC. Metabolic syndrome: perception or reality? *Curr Atheroscler Rep.*, 11(4):264{271, 2009.

<sup>3</sup>Goldberg E and Krause I. Infection and type 1 diabetes mellitus - a two edged sword? *Autoimmun Rev.*, 8(8):682{6, 2009.

<sup>4</sup>Concannon P, Rich SS, and Nepom GT. Genetics of type 1a diabetes. *N Engl J Med.*, 360(16):1646{54, 2009.

<sup>5</sup>S. Brunton. Beyond glycemic control: treating the entire type 2 diabetes disorder. *Postgrad Med.*, 121:68{81, 2009.

<sup>6</sup>Bode BW. De\_ning the importance of daily glycemic control and implications for type 2 diabetes management. *Postgrad Med.*, 121(5):82{93, 2009.

<sup>7</sup>Janssen P, Rotondo A, Mulé F, Tack J. Review article: a comparison of glucagon-like peptides 1 and 2. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013 Jan;37(1):18-36.

<sup>8</sup>Donnelly D. The structure and function of the glucagon-like peptide-1 receptor and its ligands. *Br J Pharmacol.* 2012 May;166(1):27-41.

<sup>9</sup>Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev.* 2007 Oct;87(4):1409-39. Review.



Il GLP-1 ha suscitato grande interesse come strumento farmacologico per il trattamento del diabete di tipo 2 perché in grado di stimolare l'esocitosi di granuli di insulina da parte delle beta cellule pancreatiche, di inibire la secrezione di glucagone da parte delle alfa cellule e di stimolare la proliferazione delle cellule beta. Quindi appurata l'importanza dell'iper-glucagonemia e dell'insulino-resistenza nello sviluppo e nella progressione del diabete di tipo 2, il GLP-1 è importante proprio per la sua azione glucagono-statica, per il suo effetto insulintropico e per il fatto che si trova stranamente diminuito nei pazienti con questa patologia<sup>10,11</sup>.

Mentre in vivo solo piccole quantità di GLP-1 raggiungono il pancreas in forma bioattiva, alcune osservazioni indicano che il GLP-1 potrebbe essere prodotto a livello delle isole pancreatiche umane. Recentemente, è stato pubblicato un lavoro prodotto nel nostro laboratorio in cui abbiamo effettuato studi morfologici, funzionali e molecolari dimostrando la presenza e analizzando le varie caratteristiche di un sistema di produzione locale di GLP-1 negli aggregati cellulari del Langerhans umani, in particolare in quelli ottenuti da pazienti con diabete mellito tipo 2<sup>12</sup> (**Figura 1**). Inoltre, sempre nel nostro laboratorio, abbiamo condotto uno studio per valutare la secrezione e la funzione del GLP-1 in una linea cellulare di alfa cellule pancreatiche murine esposte, o meno, a perturbazioni metaboliche tipiche del diabete mellito di tipo 2. I risultati preliminari sembrano indicare che l'iperglicemia potrebbe indurre un incremento dell'espressione dell'enzima PC1/3 nelle alfa cellule, con conseguente aumento di secrezione di GLP-1, sia nella sua forma totale che attiva. L'aumento della concentrazione di GLP-1 attivo nel terreno di coltura è associato a una riduzione della necrosi, ad un aumento dell'attività metabolica e ad un aumento della

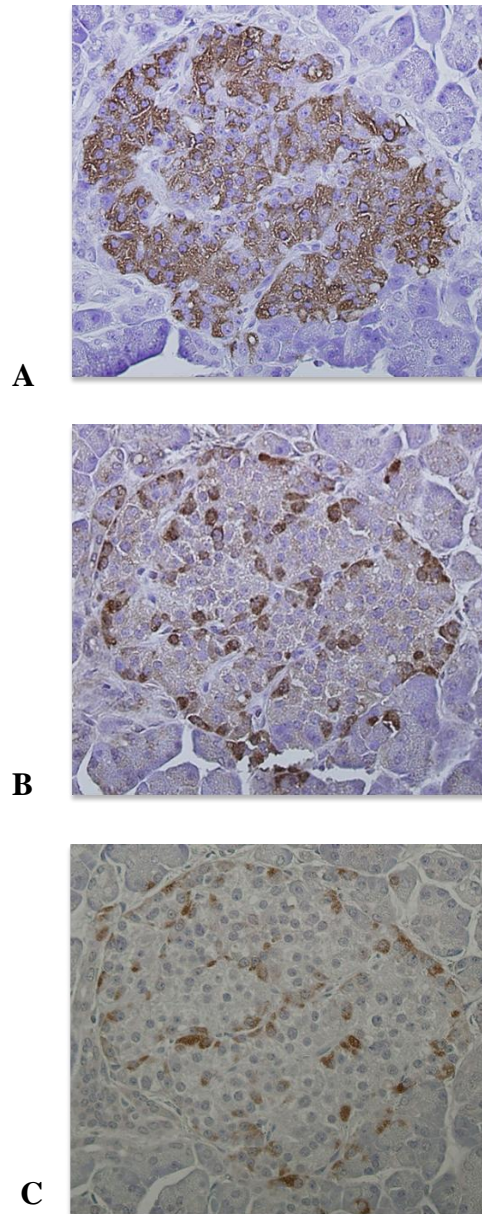
---

<sup>10</sup>Yu BS, Wang AR. Glucagon-like peptide 1 based therapy for type 2 diabetes. *World J Pediatr.* 2008 Feb;4(1):8-13.

<sup>11</sup>Avogaro A. [Cardioprotective effects of glucagon-like peptide-1: preclinical and clinical data]. *G Ital Cardiol (Rome).* 2011 Dec;12(12 Suppl 2):17-24.

<sup>12</sup>Marchetti P, Lupi R, Bugliani M, Kirkpatrick CL, Sebastiani G, Grieco FA, Del Guerra S, D'Aleo V, Piro S, Marselli L, Boggi U, Filipponi F, Tinti L, Salvini L, Wollheim CB, Purrello F, Dotta F. A local glucagon-like peptide 1 (GLP-1) system in human pancreatic islets. *Diabetologia.* 2012 Dec;55(12):3262-72.

funzionalità cellulare, che fa pensare ad un effetto protettivo del GLP-1 sulle alfa cellule stesse.



**Figura 1.** Presenza di insulina (**A**), glucagone (**B**) e GLP-1 (**C**) in isole pancreatiche umane. Fonte: Marchetti P et al. Diabetologia. 2012 Dec;55(12):3262-72.

## **1.1 Cenni sul diabete mellito**

Il diabete mellito è un disordine del metabolismo ad eziologia multipla, caratterizzato da iperglicemia cronica con alterazioni a carico del metabolismo di carboidrati, grassi e proteine per difetti di secrezione e/o di azione insulinica. Le forme cliniche più frequenti sono il diabete di tipo 1 e di tipo 2<sup>1-13</sup>: nel primo caso è presente un deficit più o meno totale di secrezione di insulina per distruzione autoimmune delle cellule beta pancreatiche, mentre l'altro tipo presenta deficit variabile di secrezione di insulina con resistenza e ridotta sensibilità alla sua azione da parte di tessuti quali muscolo, fegato e tessuto adiposo. Solitamente i pazienti colpiti da diabete di tipo 2 non sono insulino-dipendenti e se lo diventano, accade ad uno stadio avanzato della patologia. Si tratta infatti di una malattia ad esordio tardivo causata da fattori genetici, ambientali ed acquisiti che presenta un'elevata diffusione, risulta in continuo aumento ed è caratterizzata da gravi complicanze, acute e croniche, di importante impatto socio-sanitario. Attualmente in Italia a 3 milioni di persone (4.9% della popolazione) è stato diagnosticato il diabete di tipo 2 e si stima che 1 milione di persone siano affette, ma prive di una diagnosi (1.6% della popolazione), mentre 2.6 milioni di persone (4.3% della popolazione) hanno difficoltà a mantenere sotto controllo la glicemia, condizione che nella maggior parte dei casi prelude allo sviluppo del diabete di tipo 2. Quindi il 9.2 % della popolazione italiana ha problemi legati alla glicemia e si prevede che nel 2030 le persone con diabete di tipo 2 diagnosticato saliranno a 5 milioni, mentre nel mondo arriveranno a 438 milioni, cioè avremo 21 mila nuovi casi al giorno (fonte: Diabete Italia).

---

<sup>13</sup>American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2006;29 (suppl 1):S43:8.

## **1.2 Il diabete mellito di tipo 2**

Il diabete mellito di tipo 2 è la forma più frequente di diabete, colpisce il 5-10% della popolazione dei paesi industrializzati e rappresenta circa il 90% dei casi di diabete mellito<sup>7,14</sup>. Si manifesta generalmente in età avanzata, per lo più dopo i 40 anni e soprattutto in persone in sovrappeso o obese. Purtroppo però l'incremento dell'obesità e lo stile di vita sedentario, tipici della nostra società, fanno sì che il diabete di tipo 2 insorga anche in bambini e adolescenti, con frequenza sempre maggiore. Il soggetto perde gradatamente la capacità di controllare l'equilibrio glicemico e lentamente si instaura la patologia, spesso scoperta casualmente dopo un esame di routine in pazienti asintomatici oppure diagnosticata dopo molti anni, per la comparsa di complicanze. Le cause responsabili di questo disordine metabolico sono ambientali, come la sedentarietà, l'eccessiva alimentazione che porta a sovrappeso e obesità, ma anche il normale invecchiamento poiché si accompagna ad una fisiologica riduzione della sensibilità dei tessuti periferici all'insulina. Concorrono anche fattori genetici, quali polimorfismi di geni codificanti per fattori di trascrizione e proteine coinvolti nel metabolismo del glucosio, che si ripercuotono sulla funzione e sulla sopravvivenza della beta cellula<sup>15,16</sup>. Quindi, in definitiva, i meccanismi responsabili della patologia sono l'alterata secrezione di insulina e la ridotta sensibilità alla sua azione da parte di tessuti bersaglio, quali muscolo, fegato e tessuto adiposo (insulino-resistenza). Durante lo sviluppo del diabete di tipo 2, la beta cellula pancreatica non smette di produrre insulina, anzi, si possono notare livelli di insulinemia ridotti, normali o aumentati, ma in ogni caso risultano insufficienti a garantire una glicemia normale<sup>17</sup>. Ciò espone l'organismo a due

---

<sup>14</sup>Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001;414:782-7.

<sup>15</sup>Marchetti P, Del Prato S, Lupi R, Del Guerra S. The pancreatic beta-cell in human Type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006 Mar;16 Suppl 1: S3-6. Epub 2006 Feb 9. Review.

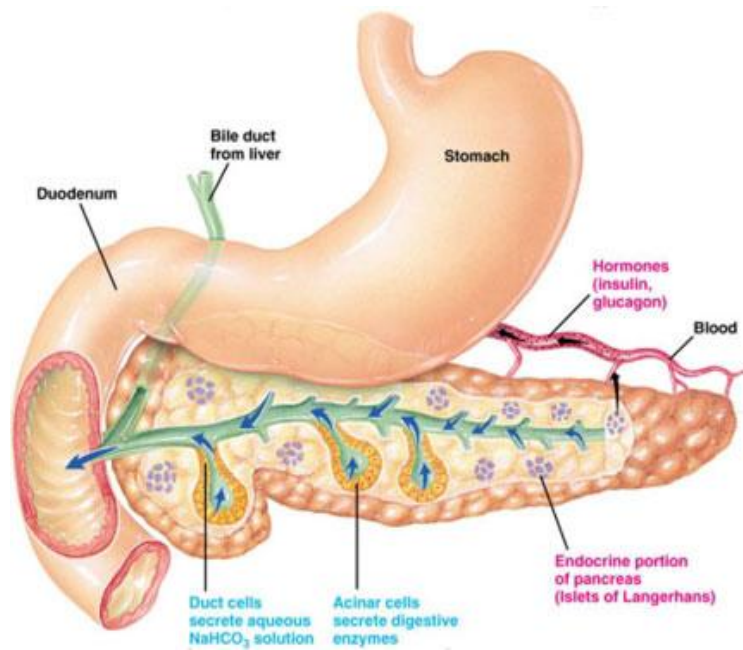
<sup>16</sup>Berdasco M, Esteller M. Genetic syndromes caused by mutations in epigenetic genes. *Hum Genet.* 2013 Apr;132(4):359-83.

<sup>17</sup>Lupi R, Del Guerra S, Mancarella R, Novelli M, Valgimigli L, Pedulli GF, Paolini M, Soleti A, Filippini F, Mosca F, Boggi U, Del Prato S, Masiello P, Marchetti P. Insulin secretion defects of human type 2 diabetic islets are corrected in vitro by a new reactive oxygen species scavenger. *Diabetes Metab.* 2007 Nov;33(5):340-5.

importanti conseguenze: la glucotossicità, cioè la prolungata esposizione ad alte concentrazioni di glucosio, alla quale concorre un'elevata secrezione di glucagone tipica di pazienti con diabete di tipo 2 e la lipotossicità, ovvero alti livelli di acidi grassi che causano un'eccessiva deposizione di trigliceridi a livello di fegato, muscolo scheletrico (normalmente non sedi di accumulo) e tessuto adiposo. La gluco-lipotossicità assume un ruolo centrale nella patologia perché alimenta ed aggrava l'insulino-resistenza, causa danni sistemici, aumenta lo stress ossidativo e conduce a morte le beta cellule pancreatiche.

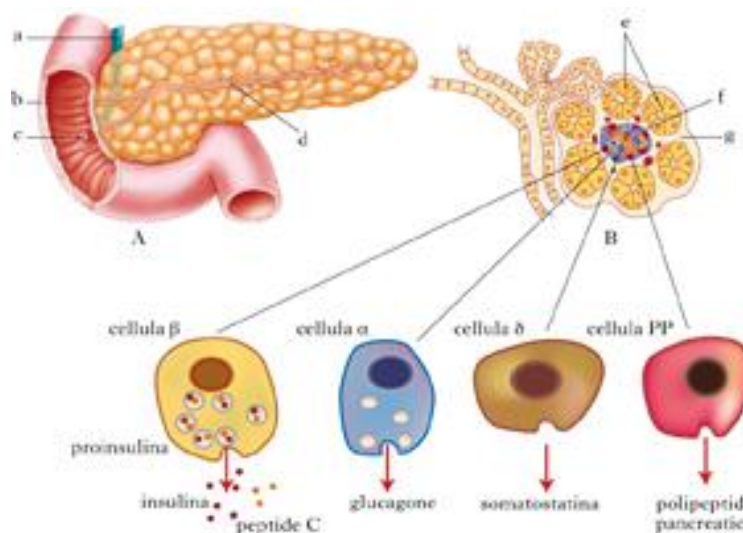
### **1.3 Struttura del pancreas**

Il pancreas è la seconda più grande ghiandola collocata nello spazio retroperitoneale della cavità addominale ed annessa al canale alimentare. E' costituita da una porzione a secrezione esterna o esocrina (acini pancreatici), essenziale per il completamento dei processi digestivi a carico dell'intestino e da una porzione a secrezione interna o endocrina (isole pancreatiche o di Langerhans), che rappresenta l'1-2% del volume dell'organo. Nel pancreas si possono distinguere tre porzioni: la testa, il corpo e la coda. Questa ghiandola misura circa 20 cm in lunghezza, 5 cm in altezza e 3 cm in spessore, pesando in media 70-80 g. La componente esocrina del pancreas è responsabile dell'elaborazione e secrezione di un particolare succo digestivo ricco di acqua, elettroliti ed enzimi proteolitici, glicolitici e lipolitici, prodotto nella quantità di circa un litro al giorno e riversato, tramite i dotti pancreatici, nella seconda porzione del duodeno.



**Figura 2.** Struttura del pancreas umano. Fonte: salute.leonardo.it.

Gli isolotti pancreatici, noti anche come isole di Langerhans, rappresentano la parte endocrina del pancreas e sono costituiti principalmente da tre tipi di cellule indicate con le lettere dell'alfabeto greco: cellule  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ .



**Figura 3.** Cellule endocrine che costituiscono l'isola del Langerhans. Fonte: treccani.it.

Le cellule alfa rappresentano il 15-20% dell'intera popolazione di un'isola e producono glucagone, un ormone polipeptidico ad azione iperglicemizzante in quanto apporta glucosio in circolo favorendo la scissione del glicogeno epatico. La secrezione del glucagone è regolata sia dall'ipoglicemia che da stimoli simpatici. Le cellule beta sono il 70-80% della popolazione cellulare di un'isola e tendono ad occuparne la parte centrale. L'ormone secreto da queste cellule, ottenuto per scissione proteolitica del precursore pre-proinsulina, è l'insulina, un polipeptide formato da due catene (la alfa di 21 aminoacidi e la beta di 30) legate da due ponti disolfuro tra molecole di cisteina. Si tratta di un ormone ipoglicemizzante che non ha un particolare organo bersaglio poiché trova i suoi recettori su quasi tutte le cellule dell'organismo sulle quali agisce favorendo la penetrazione del glucosio al loro interno. Di particolare importanza la sua azione sul fegato, dove favorisce la formazione di glicogeno, sul muscolo striato, per il quale il glucosio è la principale fonte di energia, e sul tessuto adiposo, dove il glucosio è utilizzato per la sintesi dei grassi. Lo stimolo che maggiormente induce l'immissione in circolo di insulina è l'iperglicemia. Il terzo tipo di cellula è la cellula delta, che rappresenta il 5% della popolazione cellulare insulare e secreta somatostatina, un polipeptide di 14 aminoacidi che ha un'azione locale di tipo inibitorio, modulando l'immissione in circolo di glucagone e insulina. Esiste anche un tipo di isola pancreatico nel quale al posto delle cellule alfa, presenti in percentuale minore all'1%, si trovano cellule simili ma che producono il polipeptide pancreatico (PP), sono il 15-20% della popolazione cellulare di questo tipo di isola e sono note come cellule F o PP. Il polipeptide pancreatico viene prodotto con l'ingestione di certi tipi di cibo, soprattutto quando prevale la componente proteica e sotto stimolazione vagale. Sono inoltre presenti, tra gli acini, gruppi cordoniformi di cellule scarsamente differenziate che fanno pensare ad elementi di tipo staminale destinati al rimpiazzo delle cellule sia esocrine che endocrine<sup>18,19</sup>.

---

<sup>18</sup>Proietto J, Nankervis A, Aitken P, Caruso G, Alford F. Glucose utilization in Type 1. Csorba TR, Lyon AW, Hollenberg MD. Autoimmunity and the pathogenesis of type 1 diabetes. Crit Rev Clin Lab Sci. 2010, 47(2):51-71

#### **1.4      Diabete di tipo 2 e cellule beta pancreatiche**

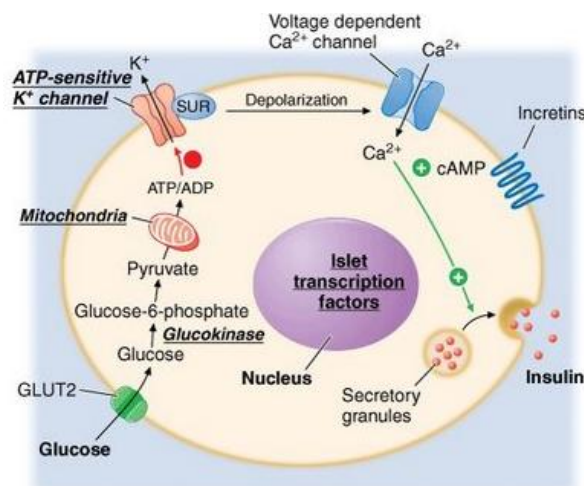
La massa beta cellulare pancreatica è prevalentemente regolata da apoptosi, replicazione, neogenesi e dalle dimensioni delle singole cellule beta<sup>20</sup>. Nei primi anni di vita la massa beta cellulare aumenta notevolmente grazie a fenomeni replicativi e di neogenesi, successivamente, si raggiunge una sorta di equilibrio che di solito viene mantenuto nella vita adulta<sup>8</sup>. Nel caso di sovrappeso od obesità l'insulino-resistenza che ne deriva è compensata da un accentuato tasso di replicazione, neogenesi e dall'aumento di dimensioni delle singole cellule<sup>8</sup>. Nel diabete di tipo 2 le cellule beta esauriscono apparentemente la loro capacità di adattarsi alle richieste di insulina, infatti, inizialmente, la secrezione di insulina aumenta per cercare di compensare l'insulino-resistenza periferica e spesso mantiene normale per anni il livello della glicemia. Nel lungo periodo, la compensazione da parte delle beta cellule, diventa però inadeguata e si sviluppa l'iperglicemia. Lo stimolo più importante per la sintesi ed il rilascio dell'insulina è il glucosio. Quando aumenta viene captato dalle cellule beta grazie al glucotrasportatore GLUT-2 e utilizzato nei mitocondri per la produzione di adenosina trifosfato (ATP) che a sua volta agisce sul canale del potassio, presente sulla membrana di queste cellule, inibendolo. Tutto ciò causa la depolarizzazione della membrana con entrata di calcio extracellulare attraverso i canali calcio voltaggio-dipendenti. L'incremento del calcio nel versante intracellulare stimola la secrezione di insulina, immagazzinata in granuli nelle beta cellule.

---

<sup>19</sup>Gero L. Type 1 diabetes mellitus: pathogenesis, symptoms and therapy]. *Orvb Hetil*,2010, 151(13):533-9. Review

<sup>20</sup>Marchetti P, Dotta F, Lauro D, Purrello F. An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: Implications for treatment. *Regul Pept* 2008;146:4-11; Rhodes CJ. Type 2 diabetes - a matter of beta-cell life and death *Science* 2005;307:380-4.





**Figura 4.** Meccanismo di rilascio dell'insulina in cellule beta pancreatiche. Fonte. harrison's principles of internal medicine 17th edition.

Se lo stimolo si protrae, si innesca una risposta che prevede anche la sintesi attiva di insulina. Ormoni intestinali e aminoacidi stimolano la secrezione di insulina, ma non la sua sintesi. L'insulina ha come funzione metabolica principale quella di far aumentare il trasporto di glucosio all'interno di alcune cellule dell'organismo, come quelle del muscolo scheletrico, del fegato e gli adipociti, mentre, per altri tessuti periferici come il cervello, la captazione del glucosio è insulino-indipendente. Nelle cellule muscolari il glucosio è conservato sotto forma di glicogeno o ossidato per produrre ATP, mentre nel tessuto adiposo è immagazzinato come lipidi. L'insulina inibisce la degradazione di glicogeno, lipidi e proteine promuovendone la sintesi. Il recettore dell'insulina è una proteina tetramerica composta da due subunità alfa e due beta. Il dominio citosolico della subunità beta possiede attività tirosin-chinasica che si attiva quando l'insulina lega il dominio alfa extracellulare. Il recettore in questo modo si autofosforila e vengono fosforilate anche numerose proteine che regolano cascate multiple a valle le quali mediano le attività dell'insulina sulla cellula, come per esempio il traffico, verso la membrana, di vescicole contenenti il trasportatore del glucosio GLUT-4, per promuoverne la captazione.

## 1.5 Diabete di tipo 2 e cellule alfa pancreatiche

Solo negli ultimi anni la ricerca scientifica ha cominciato a studiare il ruolo e la funzione dell'alfa cellula nella fisiopatologia insulare. Una delle caratteristiche peculiari dei pazienti con diabete di tipo 2 è l'eccessiva concentrazione di glucagone in circolo rispetto all'atteso e ciò contribuisce ad una maggior produzione di glucosio da parte del fegato<sup>21</sup>. E' stato anche dimostrato che le alfa cellule di pazienti diabetici possiedono una ridotta sensibilità all'effetto inibitorio dell'iperglicemia<sup>22</sup>. I pazienti diabetici se stimolati con arginina, aumentano la produzione di glucagone in maniera eccessiva, ciò suggerisce una resistenza all'effetto inibitorio dell'insulina proprio perché stimolata dallo stesso aminoacido. Emerge quindi che i meccanismi regolatori tipici degli isolotti pancreatici sono decisamente alterati in pazienti con questa patologia<sup>23,24</sup>. In più alcuni autori hanno evidenziato un aumento delle alfa cellule nelle isole pancreatiche di pazienti con diabete di tipo 2<sup>25</sup>, associato al decremento delle cellule beta<sup>26</sup>. Nonostante sia necessario un approfondimento, è evidente che queste cellule presentano alterazioni che possono contribuire allo sviluppo e alla progressione della patologia diabetica.

---

<sup>21</sup>Baron AD, Schaeffer L, Shragg P, Kolterman OG. Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics. *Diabetes* 1987;36:274-83

<sup>22</sup>Ohneda A, Watanabe K, Horigome K, Sakai T, Kai Y, Oikawa S. Abnormal response of pancreatic glucagon to glycemic changes in diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1978;46:504-10

<sup>23</sup>Unger RH, Aguilar-Parada E, Muller WA, Eisentraut AM. Studies of pancreatic alpha cell function in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest* 1970;49:847-8.

<sup>24</sup>D'Alessio D. The role of dysregulated glucagon secretion in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2011 Oct;13 Suppl 1:126-32.

<sup>25</sup>Yoon KH, Ko SH, Cho JH, Lee JM, Ahn YB, Song KH, et al. Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2300-8.

<sup>26</sup>Deng S, Vatamaniuk M, Huang X, Doliba N, Lian MM, Frank A, et al. Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 2004;53:624-32.

## **1.6 Insulino-resistenza, glucotossicità e lipotossicità**

Il diabete di tipo 2 è una complessa patologia multifattoriale caratterizzata sostanzialmente da una minore capacità dei tessuti periferici di rispondere all'insulina (insulino-resistenza)<sup>27</sup> e dalla disfunzione delle beta cellule pancreatiche, che si manifesta con inadeguata secrezione di insulina in risposta ad insulino-resistenza ed iperglicemia. L'insulino-resistenza precede l'iperglicemia per cui, nelle fasi iniziali dello sviluppo del diabete, è solitamente accompagnata da iperfunzionamento delle cellule beta ed iperinsulinemia. Un fattore importante che contribuisce all'instaurarsi di questa resistenza è l'obesità, comune nell'80% dei pazienti con diabete di tipo 2, ma l'insulino-resistenza si ritrova anche in soggetti obesi senza però iperglicemia, a dimostrazione della stretta correlazione tra questo fenomeno e l'eccesso di adipe. Anche la distribuzione del grasso ha un effetto sulla sensibilità all'insulina, infatti l'obesità addominale è maggiormente associata all'insulino-resistenza, rispetto ad un'obesità periferica. In più il tessuto adiposo secerne anche un gran numero di citochine proinfiammatorie che aumentano lo stress cellulare, che attiva, a cascata, una serie di meccanismi capaci di contrastare l'azione dell'insulina sui tessuti periferici. L'insulino-resistenza è quindi definita come l'incapacità dei tessuti bersaglio di rispondere all'insulina e comporta un minor assorbimento del glucosio da parte del muscolo, una ridotta glicolisi e incapacità di sopprimere la gluconeogenesi a livello epatico, con conseguente aumento dei livelli di glucosio in circolo (glucotossicità) ed accentuata lipolisi a livello del tessuto adiposo viscerale con incremento di acidi grassi liberi (FFA). Inoltre, l'eccessivo introito di nutrienti, associato ad una vulnerabilità metabolica individuale, magari geneticamente predeterminata, concorre ad un'esagerata deposizione di trigliceridi nel comparto adiposo viscerale e in distretti come fegato e muscolo scheletrico, normalmente non sedi di accumulo, comportando un eccesso di acidi grassi liberi per accentuata lipolisi del tessuto adiposo. Quindi, unendo glucotossità e lipotossicità, si ottiene un peggioramento dell'insulino-resistenza pre-esistente, che va ad alimentare un ciclo

---

<sup>27</sup>Soumaya K. Molecular mechanisms of insulin resistance in diabetes. Adv Exp Med Biol. 2012;771:240-51. Review.

di amplificazione fino all'ottenimento delle gravi complicanze tipiche della patologia diabetica. Analizzando nello specifico ciò che accade a livello delle isole pancreatiche si nota che l'accumulo di acidi grassi liberi provoca una disregolazione del rilascio di insulina fino all'esaurimento funzionale della cellula beta con perdita di massa insulare<sup>28,29,30,31</sup>. Studi presenti in letteratura dimostrano che isole pancreatiche umane esposte per 48 ore ad un'elevata concentrazione di acidi grassi liberi presentano un tasso di apoptosi beta cellulare molto aumentato<sup>32,33</sup>, che scompare quando sono inibite le caspasi, responsabili del meccanismo di morte cellulare programmata e viene parzialmente inibito bloccando la formazione di ceramide, derivante dal metabolismo degli FFA<sup>34,35</sup>. E' stato poi dimostrato che vari FFA hanno effetti diversi: l'acido oleico sembra avere effetto protettivo, mentre gli acidi grassi a lunga catena (palmitico e stearico) sarebbero dannosi per la beta cellula, in particolare quando associati ad alte concentrazioni di glucosio (gluco-lipotossicità)<sup>36,37,38</sup>. Altri studi, vedono isole pancreatiche esposte per 5 giorni ad una concentrazione di glucosio di 300 mg/dl,

---

<sup>28</sup>Boslem E, Meikle PJ, Biden TJ. Roles of ceramide and sphingolipids in pancreatic  $\beta$ -cell function and dysfunction. *Islets*. 2012 May-Jun;4(3):177-87.

<sup>29</sup>Shao S, Yang Y, Yuan G, Zhang M, Yu X. Signaling molecules involved in lipid-induced pancreatic beta-cell dysfunction. *DNA Cell Biol*. 2013 Feb;32(2):41-9.

<sup>30</sup>Cusi K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology*. 2012 Apr;142(4):711-725.

<sup>31</sup>Gupta D, Krueger CB, Lastra G. Over-nutrition, obesity and insulin resistance in the development of  $\beta$ -cell dysfunction. *Curr Diabetes Rev*. 2012 Mar;8(2):76-83. Review.

<sup>32</sup>Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. Cunha DA, Hekerman P, Ladriere L, Bazarra-Castro A, Ortis F, Wakeham MC, Moore F, Rasschaert J, Cardozo AK, Bellomo E, Overbergh L, Mathieu C, Lupi R, Hai T, Herchuelz A, Marchetti P, Rutter GA, Eizirik DL, Cnop M. *J Cell Sci*. 2008 Jul 15;121(Pt 14):2308-18.

<sup>33</sup>Cnop M, Ladriere L, Igoillo-Esteve M, Moura RF, Cunha DA. Causes and cures for endoplasmic reticulum stress in lipotoxic  $\beta$ -cell dysfunction. *Diabetes Obes Metab*. 85 2010 Oct;12 Suppl 2:76-82. doi: 10.1111/j.1463-1326.2010.01279.x. Review.

<sup>34</sup>Boslem E, Meikle PJ, Biden TJ. Roles of ceramide and sphingolipids in pancreatic  $\beta$ -cell function and dysfunction. *Islets*. 2012 May-Jun;4(3):177-87. doi: 10.4161/isl.20102. Review.

<sup>35</sup>Summers SA. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res*. 2006 Jan;45(1):42-72.

<sup>36</sup>Lupi R, Dotta F, Marselli L, Del Guerra S, Masini M, Santangelo C, Patane G, Boggi U, Piro S, Anello M, Bergamini E, Mosca F, Di Mario U, Del Prato S, Marchetti P. 84 Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes*. 2002 May;51 (5):1437-42.

<sup>37</sup>Baldwin AC, Green CD, Olson LK, Moxley MA, Corbett JA. A role for aberrant protein palmitoylation in FFA-induced ER stress and  $\beta$ -cell death. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012 Jun 1;302(11):E1390-8.

<sup>38</sup>Las G, Serada SB, Wikstrom JD, Twig G, Shirihai OS. Fatty acids suppress autophagic turnover in  $\beta$ -cells. *J Biol Chem*. 2011 Dec 9;286(49):42534-44. Epub 2011 Aug 21.

colpite da eventi apoptotici significativamente maggiori rispetto ad un'esposizione a concentrazioni normali (glucosio 100 mg/dl) ed anche quando l'esposizione ad alto glucosio viene alternata ogni 24h con una concentrazione normale, l'aumento di apoptosi si mantiene<sup>39,40,41</sup>. Si può quindi dedurre, in accordo con le alterazioni morfologiche rilevate in mitocondri di beta cellule esposte ad iperglicemia, che elevate concentrazioni di glucosio portano ad un aumento di produzione di radicali liberi dell'ossigeno provenienti soprattutto dal metabolismo mitocondriale ma anche attraverso la via delle esosamine, con conseguente aumento dello stress ossidativo, come dimostrato in isole pancreatiche di soggetti sani trattate con alto glucosio ed anche in isole di pazienti con diabete di tipo 2<sup>42,43,44,45,46</sup>.

## 1.7 Le incretine

Le incretine (**intestine secretion insuline**) sono ormoni nutriente-dipendenti, secreti dall'intestino in risposta al cibo, che hanno la funzione di preparare intestino e pancreas alla digestione e alla secrezione ormonale; infatti, migliorano molto la secrezione insulinica glucosio-dipendente ed è proprio grazie all'azione di questi ormoni peptidici che, il glucosio somministrato per via orale, scatena una

---

<sup>39</sup>Marchetti P, Del Prato S, Lupi R, Del Guerra S. The pancreatic beta-cell in human Type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006 Mar;16 Suppl 1:S3-6.

<sup>40</sup>Welsh N, Cnop M, Kharroubi I, Bugliani M, Lupi R, Marchetti P, Eizirik DL. Is there a role for locally produced interleukin-1 in the deleterious effects of high glucose or the type 2 diabetes milieu to human pancreatic islets? *Diabetes.* 2005 Nov;54(11):3238-44.

<sup>41</sup>Marchetti P, Lupi R, Del Guerra S, Bugliani M, Marselli L, Boggi U. The beta-cell in human type 2 diabetes. *Adv Exp Med Biol.* 2010;654:501-14. Review.

<sup>42</sup>Anello M, Lupi R, Spampinato D, Piro S, Masini M, Boggi U, Del Prato S, Rabuazzo AM, Purrello F, Marchetti P. Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia.* 2005 Feb;48(2):282-9.

<sup>43</sup>Novelli M, D'Aleo V, Lupi R, Paolini M, Soleti A, Marchetti P, Masiello P. Reduction of oxidative stress by a new low-molecular-weight antioxidant improves metabolic alterations in a nonobese mouse diabetes model. *Pancreas.* 2007 Nov;35(4):e10-7.

<sup>44</sup>Lightfoot YL, Chen J, Mathews CE. Oxidative stress and beta cell dysfunction. *Methods Mol Biol.* 2012;900:347-62. doi: 10.1007/978-1-60761-720-4\_17.

<sup>45</sup>Stadler K. Oxidative stress in diabetes. *Adv Exp Med Biol.* 2012;771:272-87. Review.

<sup>46</sup>Goossens GH. The renin-angiotensin system in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Obes Facts.* 2012;5(4):611-24.

maggior risposta insulinica rispetto alla via ematica<sup>47,48,49</sup>. All'interno della famiglia delle incretine sono stati individuati due composti maggiormente responsabili della stimolazione insulinica: il glucose-dependent insulintropic polipeptide (GIP), polipeptide di 42 aminoacidi secreto dalle cellule K intestinali ed il Glucagon-like peptide 1 (GLP-1), polipeptide di 30 aminoacidi prodotto dalle cellule L intestinali<sup>50,51,52,53</sup>. Entrambi possiedono però un'emivita di circa 2 minuti perchè vanno incontro a rapida inattivazione da parte dell'enzima dipeptidil peptidasi-IV (DPP-4), un'aminopeptidasi ubiquitaria ancorata alla membrana cellulare che può esser trasformata in una forma solubile presente nella circolazione sistemica.

---

<sup>47</sup>Kim W, Egan JM. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacol Rev.* 2008 Dec;60(4):470-512. doi: 10.1124/pr.108.000604. Epub 2008 Dec 12. Review.

<sup>48</sup>Nauck M, Stöckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia.* 1986 Jan;29(1):46-52.

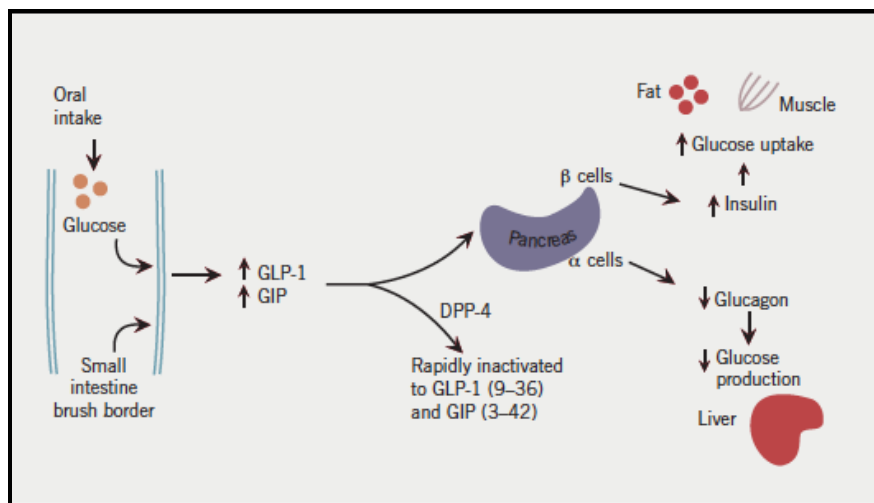
<sup>49</sup>Nauck MA, El-Ouaghli A, Gabrys B, Hücking K, Holst JJ, Deacon CF, Gallwitz B, Schmidt WE, Meier JJ. Secretion of incretin hormones (GIP and GLP-1) and incretin effect after oral glucose in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Regul Pept.* 2004 Nov 15;122(3):209-17.

<sup>50</sup>Drucker DJ. Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *Mol Endocrinol.* 2003 Feb;17(2):161-71. Review.

<sup>51</sup>Zarrinpar A, Loomba R. Review article: the emerging interplay among the gastrointestinal tract, bile acids and incretins in the pathogenesis of diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012 Nov;36(10):909-21. doi: 10.1111/apt.12084. Epub 2012 Oct 11. Review.

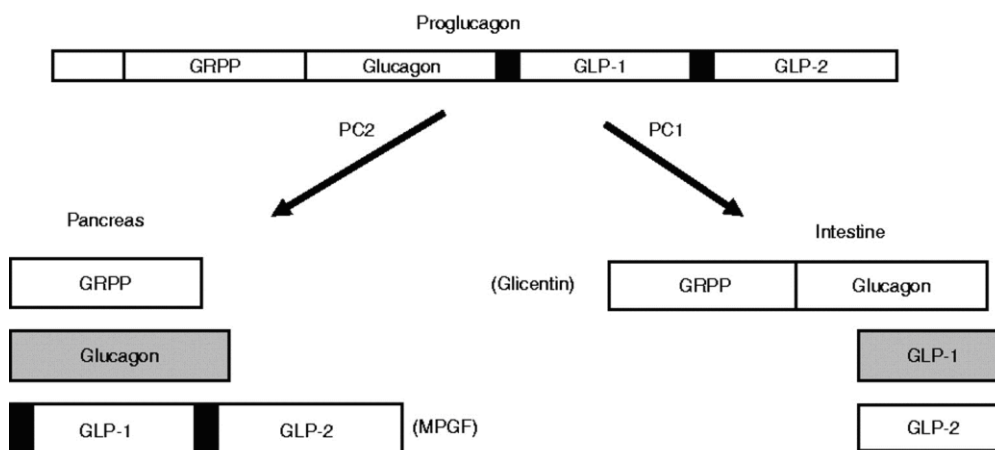
<sup>52</sup>Deacon CF, Ahrén B. Physiology of incretins in health and disease. *Rev Diabet Stud.* 2011 Fall;8(3):293-306. doi: 10.1900/RDS.2011.8.293. Epub 2011 Nov 10. Review.

<sup>53</sup>Kazafeos K. Incretin effect: GLP-1, GIP, DPP4. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011 Aug;93 Suppl 1:S32-6. doi: 10.1016/S0168-8227(11)70011-0. Review.



**Figura 5.** Meccanismo d'azione di GIP e GLP-1. Fonte: The British Journal of Cardiology.

Il GLP-1 ha come progenitore il proglucagone e viene prodotto, insieme al Glucagon-like peptide 2 (GLP-2), grazie all'azione dell'enzima PC1/3 presente nelle cellule L-intestinali.



**Figura 6.** Processamento del proglucagone in pancreas e intestino. Fonte: Journal of Endocrinology.

Il GLP-1 bioattivo esiste in due forme equipollenti il GLP-1 7-36NH<sub>2</sub> e il GLP-1 7-37, ma in circolo il primo è predominante<sup>54</sup>. L'ingestione del cibo è lo stimolo principale che induce le cellule L intestinali a secernere GLP-1 e lo fanno in due fasi, producendo un primo picco di concentrazione massima dopo 15-30 minuti dal pasto ed un secondo picco minore dopo 90-120 minuti<sup>46</sup>. Il GLP-1 possiede molte azioni fisiologiche: è in grado di potenziare la secrezione di insulina glucosio-stimolata, aumentare la crescita e la sopravvivenza delle cellule beta pancreatiche riducendone l'apoptosi così da aumentarne la massa complessiva<sup>55</sup>, inibire il rilascio di glucagone da parte delle alfa cellule pancreatiche e rallentare lo svuotamento gastrico, riducendo l'assunzione di cibo<sup>46</sup>. Gli effetti antidiabetici di questa molecola, uniti al fatto che il GLP-1 si trova ridotto nei pazienti con diabete di tipo 2<sup>29</sup>, hanno incrementato l'interesse verso questa incretina come un possibile trattamento proprio per i pazienti colpiti da tale patologia<sup>56,57,58</sup>. Infatti negli anni sono state esplorate diverse strategie farmacologiche finalizzate a riprodurre o potenziarne l'azione<sup>59</sup>, ma in sintesi sono tre i gruppi di sostanze utilizzate, oltre allo stesso GLP-1, con effetto incretino-mimetico: ormoni naturali simil-GLP-1 (Exendin-4, Exenatide)<sup>60,61</sup>,

---

<sup>54</sup>Gareth E. Lim and Patricia L. Brubaker. Glucagon-Like Peptide 1 Secretion by the L-Cell. The View From Within. doi: 10.2337/db06-S020 Diabetes December 2006 vol. 55 no. Supplement 2 S70-S77.

<sup>55</sup>Farilla L, Hui H, Bertolotto C, Kang E, Bulotta A, Di Mario U, Perfetti R: Endocrinology 143, 4397-4408, 2002; Farilla L, Bulotta A, Hirshberg B, Li Calzi S, Khoury N, Noushmehr H, Bertolotto C, Di Mario U, Harlan DM, Perfetti R . Endocrinology 144, 5149-5158,2003

<sup>56</sup>Brunton SA. Integrating incretin-based therapy into type 2 diabetes management. J Fam Pract. 2013 Jun;62(6 Suppl CME):S1-8.

<sup>57</sup>Umpierrez GE, Korytkowski M. Is Incretin-Based Therapy Ready for the Care of Hospitalized Patients With Type 2 Diabetes?: Insulin therapy has proven itself and is considered the mainstay of treatment. Diabetes Care. 2013 Jul;36(7):2112-7.

<sup>58</sup>Gale E. Incretin therapy: should adverse consequences have been anticipated? BMJ. 2013 Jun 10;346:f3617.

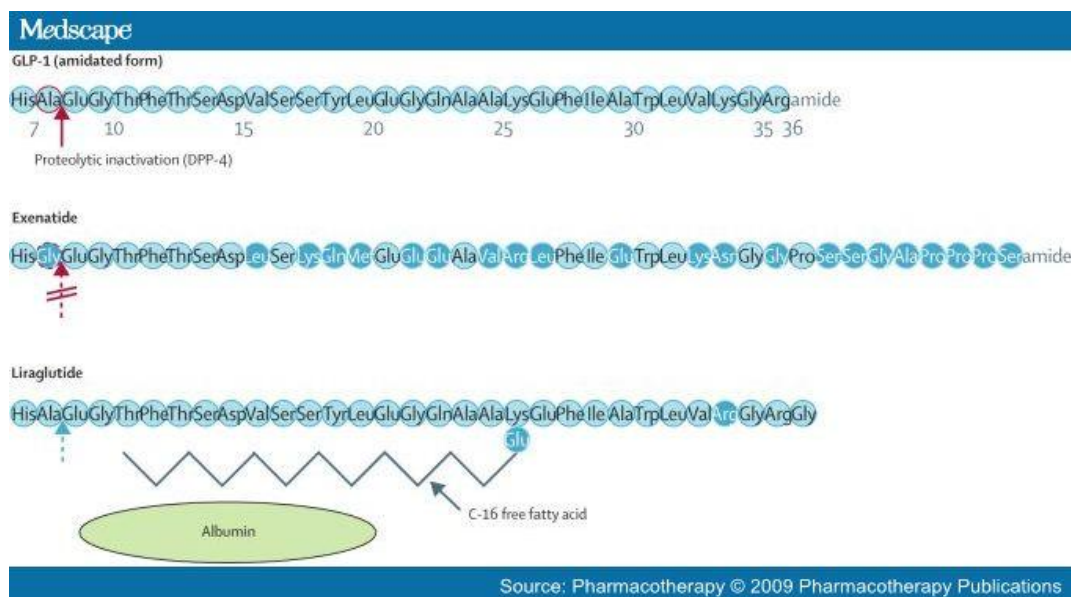
<sup>59</sup>Gupta V. Glucagon-like peptide-1 analogues: An overview. Indian J Endocrinol Metab. 2013 May;17(3):413-21.

<sup>60</sup>Egecioglu E, Engel JA, Jerlhag E. The glucagon-like Peptide 1 analogue, exendin-4, attenuates the rewarding properties of psychostimulant drugs in mice. PLoS One. 2013 Jul 16;8(7):e69010.

<sup>61</sup>Petersen AB, Christensen M. Clinical potential of lixisenatide once daily treatment for type 2 diabetes mellitus. Diabetes Metab Syndr Obes. 2013 Jun 17;6:217-31.



analoghi sintetici del GLP-1 (Liraglutide)<sup>62,63</sup> e inibitori dell'enzima DPP-4 (Vidagliptin, Sitagliptin, Linagliptin)<sup>64,65,66,67</sup>.



**Figura 7.** Struttura di GLP-1, Exenatide e Liraglutide.

Somministrando sostanze analoghe al GLP-1 ma resistenti alla degradazione da parte di DPP-4, si ottiene la persistenza del GLP-1-analogo in circolo anche in pazienti che ne producono meno. Fra questi analoghi è stato testato ed approvato

<sup>62</sup>Baruah MP, Chaudhury T, Sethi BK, Dharmalingam M. Liraglutide in type 2 diabetes mellitus. J Indian Med Assoc. 2012 May;110(5):335-8. Review.

<sup>63</sup>Shyangdan D, Cummins E, Royle P, Waugh N. Liraglutide for the treatment of type 2 diabetes. Health Technol Assess. 2011 May;15 Suppl 1:77-86.

<sup>64</sup>Lankas GR, Leitinger B, Roy RS, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibition for the treatment of type-2 diabetes: potential importance of selectivity over dipeptidyl peptidases 8 and 9. Diabetes 2005;54:2988-2994.

<sup>65</sup>Charbonnel B, Schweizer A, Dejager S. Combination therapy with DPP-4 inhibitors and insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: what is the evidence? Hosp Pract (1995). 2013 Apr;41(2):93-107.

<sup>66</sup>Brown DX, Choudhury M, Evans M. Linagliptin as add-on therapy for type 2 diabetes - an overview. Drugs Today (Barc). 2012 Oct;48(10):645-54.

<sup>67</sup>Guerce B, Monnier L, Serusclat P, Petit C, Valensi P, Huet D, Raccach D, Colette C, Quéré S, Dejager S. Continuous glucose profiles with vildagliptin versus sitagliptin in add-on to metformin: results from the randomized Optima study. Diabetes Metab. 2012 Oct;38(4):359-66.

L'Exendin-4, estratto dalla saliva di una grossa lucertola e chiamato commercialmente Exenatide. L'Exendin-4 possiede un'omologia del 52% con il GLP-1 umano e conserva l'affinità per il suo recettore<sup>68,69</sup>. Un vantaggio dell'Exenatide, oltre all'azione antidiabetica, è la riduzione dell'appetito che porta spesso a perdita di peso così da ridurre il frequente binomio diabete-obesità. Unico svantaggio è la sua somministrazione giornaliera e sottocutanea. Il Liraglutide è un analogo sintetico del GLP-1 ottenuto aggiungendo alla sua sequenza originale l'acido palmitico (acido grasso a 16 atomi di carbonio) ancorato tramite un residuo di glutammato, a sua volta legato ad una lisina in posizione 26, e sostituendo una lisina con un'arginina in posizione 34. Le modifiche apportate fanno sì che l'assorbimento sia più lento, l'emivita risulti maggiore grazie al legame dell'acido grasso con l'albumina presente in circolo e la degradazione da parte dell'enzima DPP-4 avanzi più lentamente<sup>53,56</sup>. L'approccio terapeutico con inibitori della DPP-4 è finalizzato al potenziamento dell'azione di GIP e GLP-1 endogeni, determinando un aumento delle loro concentrazioni in circolo al fine di ottenere effetti antidiabetici quali stimolazione della secrezione insulinica, inibizione di quella del glucagone e rallentamento dello svuotamento gastrico<sup>53-56</sup>. Quindi l'impiego di questa classe di farmaci nella terapia del diabete di tipo 2 è molto interessante proprio per l'estrema efficacia fin ora dimostrata e per i loro potenziali effetti che si suppone siano ancora tutti da scoprire.

## **1.8 Diabete di tipo 2 e iper glucagonemia**

Il glucagone è un ormone la cui funzione principale è quella di indurre il fegato a produrre e rilasciare glucosio nel sangue evitando quindi che le

---

<sup>68</sup>Kang HM, Kang Y, Chun HJ, Jeong JW, Park C. Evaluation of the in vitro and in vivo angiogenic effects of exendin-4. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Apr 26;434(1):150-4.

<sup>69</sup>Gupta NA, Kolachala VL, Jiang R, Abramowsky C, Romero R, Fifadara N, Anania F, Knechtle S, Kirk A. The glucagon-like peptide-1 receptor agonist Exendin 4 has a protective role in ischemic injury of lean and steatotic liver by inhibiting cell death and stimulating lipolysis. *Am J Pathol*. 2012 Nov;181(5):1693-701.

concentrazioni di tale substrato energetico scendano al di sotto dei livelli normali in un soggetto a digiuno, cioè a partire da 2 ore dopo il pasto e fino al pasto seguente. Il suo compito è importante per mantenere in funzione tutti gli organi anche quando il glucosio assunto con l'alimentazione è terminato, per cui quando aumenta il glucagone aumenta di conseguenza anche la glicemia. L'insulina invece ha funzione opposta, ritira dal sangue il glucosio assunto con l'alimentazione e fa sì venga immagazzinato sotto forma di glicogeno e lipidi in distretti come fegato, tessuto adiposo e muscolo scheletrico. Nel paziente con diabete di tipo 2 e insulino-resistenza l'equilibrio tra insulina e glucagone viene meno perché sia il pancreas che il fegato sono resistenti all'azione dell'insulina che non riesce a far calare la produzione di glucagone da parte delle alfa cellule pancreatiche e nemmeno ad agire sul fegato affinché cessi di produrre e rilasciare glucosio, in più sul fegato continua ad agire indisturbato il glucagone con conseguente innalzamento della glicemia. E' stato anche documentato che le cellule alfa presentano una minor capacità di riconoscere l'iperglicemia come effetto inibitorio sulla produzione di glucagone. Nel paziente affetto da diabete di tipo 2 si riscontrano livelli di glucagone più alti del normale che portano alle classiche iperglicemie a digiuno riscontrabili nei diabetici. Da molto tempo si sospetta un ruolo del glucagone nella patogenesi del diabete di tipo 2, proprio per la sua secrezione anormale che contribuisce ad un'errata regolazione del glucosio e quindi all'iperglicemia diabetica. Il glucagone è rilasciato dalle alfa cellule pancreatiche in risposta ai nutrienti assunti con i pasti, agli aminoacidi, a stimoli provenienti dal sistema nervoso autonomo e all'ipoglicemia<sup>70,71</sup>. I livelli di glucagone endogeno sono maggiori nelle vene drenanti il pancreas e nella vena porta epatica per il fatto che il suo principale bersaglio è il fegato. Il recettore ad alta specificità per il glucagone è abbondantemente espresso dagli epatociti e la sua attivazione media l'aumento di produzione di glucosio da parte del fegato. Quindi il glucagone è implicato nel controllo dell'omeostasi del glucosio e nel suo incremento dopo i pasti, infatti il segnale che media è compatibile con il rapido

---

<sup>70</sup>Dunning BE, Gerich JE. The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications. *Endocr Rev* 2007; 28: 253–283.

<sup>71</sup>Gromada J, Franklin I, Wollheim CB. Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocr Rev* 2007; 28: 84–116.

incremento di produzione di glucosio epatico che si concretizza con l'aumento della glicemia. Le alfa cellule pancreatiche, nei pazienti affetti da diabete di tipo 2, presentano delle caratteristiche anormali. E' stato rilevato che in uno stato di insulinopenia e chetoacidosi le concentrazioni plasmatiche di glucagone sono estremamente elevate<sup>62,72</sup>, ma d'altro canto l'iperglucagonemia a digiuno è presente solo in alcuni pazienti con diabete di tipo 2<sup>73,74,75</sup>, nei quali il meccanismo di secrezione del glucagone non risponde agli elevati livelli di glucosio<sup>76,77,78</sup>, come invece accade normalmente nei soggetti non diabetici. Gli individui con diabete presentano una risposta all'iperglicemia diminuita o assente, così il glucagone plasmatico rimane elevato in maniera inappropriata rispetto ai relativi livelli di glucosio. Inoltre, stimoli che agiscono normalmente sulle alfa cellule determinando un aumentato rilascio di glucagone, come pasti ricchi in arginina o proteine, nei pazienti diabetici hanno effetti molto maggiori rispetto al normale<sup>66,70</sup>. Tutti questi difetti nel funzionamento delle alfa cellule portano a risposte fisiologiche anormali che non sono ancora ben definite e che vanno quindi chiarite, ma c'è grande consenso nel ritenere che l'iperglicemia a digiuno nel diabete sia un risultato diretto della produzione non regolamentata di glucosio a livello epatico. Molti studi, effettuati in soggetti diabetici, hanno evidenziato una stretta correlazione tra l'elevata produzione epatica di glucosio ed il veloce incremento dei suoi livelli nel sangue<sup>65</sup>. Bisogna ricordare inoltre che i soggetti con diabete presentano una resistenza del fegato all'azione dell'insulina che, unita

---

<sup>72</sup>Muller WA, Faloona GR, Unger RH. Hyperglucagonemia in diabetic ketoacidosis. Its prevalence and significance. *Am J Med* 1973; 54 : 52–57

<sup>73</sup>Baron AD, Schaeffer L, Shragg P, Kolterman OG. Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics. *Diabetes* 1987; 36: 274–283

<sup>74</sup>Unger RH, Aguilar-Parada E, Muller WA, Eisentraut AM. Studies of pancreatic alpha cell function in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest* 1970; 49: 837–848

<sup>75</sup>ReavenGM, ChenYD, GolayA, SwislockiAL, JaspanJB. Documentation of hyperglucagonemia throughout the day in nonobese and obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64: 106–110

<sup>76</sup>Unger RH, Eisentraut AM, McCall CM, Madison LL. Measurements of endogenous glucagon in plasma and the influence of blood glucose concentration upon its secretion. *J Clin Invest* 1962; 41: 682–689.

<sup>77</sup>Aronoff SL, Bennett PH, Unger RH. Immunoreactive glucagon (IRG) responses to intravenous glucose in prediabetes and diabetes among Pima Indians and normal Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 1977; 44: 968–972.

<sup>78</sup>Unger RH. Glucagon physiology and pathophysiology in the light of new advances. *Diabetologia* 1985; 28: 574–578.68.

a insufficienti livelli della stessa, contribuisce all'impatto del glucagone sul metabolismo del glucosio epatico. Gli individui con diabete di tipo 2 presentano un rilascio di insulina diminuito o assente in risposta al glucosio ed un decremento di sensibilità delle beta cellule ai livelli glicemici. Queste caratteristiche sono supportate da studi effettuati su isole pancreatiche provenienti da pazienti affetti<sup>79</sup>. L'insensibilità delle alfa cellule agli effetti soppressivi del glucosio è suggerita dai livelli elevati o inappropriati di glucagone in soggetti con iperglicemia a digiuno<sup>65-67</sup>: infatti, il calo del glucagone plasmatico, in risposta a livelli prefissati di iperglicemia, è ridotto se comparato con individui normali<sup>80</sup>. Il meccanismo in base al quale l'iperglicemia sopprime il rilascio di glucagone non è completamente noto. Esiste una considerevole evidenza sperimentale che vede implicata l'insulina in questo processo<sup>81,82</sup>, ciò aumenta la possibilità che la disfunzione delle beta cellule possa contribuire alla disfunzione delle alfa cellule. Tuttavia è molto probabile che la situazione sia più complessa e ci siano altri fattori di regolazione come ad esempio la somatostatina secreta dalle cellule delta o segnali neurali e nutrienti, coinvolti nella risposta al glucosio delle cellule alfa<sup>63</sup>. Lo stimolo primario che induce il rilascio di glucagone è l'ipoglicemia, ma non è stato ancora chiarito se sono i bassi livelli di glucosio o altri stimoli a mediare la secrezione di glucagone in risposta all'ipoglicemia<sup>63</sup>. Recenti scoperte supportano un modello in cui forti riduzioni di insulina, in risposta al crollo di glucosio nel sangue, liberano le alfa cellule dalle inibizioni e permettono loro di rilasciare glucagone<sup>83,84,85</sup>. Questo risultato è coerente con la gerarchia della risposta

---

<sup>79</sup>Deng S, Vatamaniuk M, Huang X et al. Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 2004; 53: 624–632

<sup>80</sup>Ward WK, Bolgiano DC, McKnight B, Halter JB, Porte D Jr. Diminished B cell secretory capacity in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1984; 74: 1318–1328.

<sup>81</sup>Maruyama H, Hisatomi A, Orci L, Grodsky GM, Unger RH. Insulin within islets is a physiologic glucagon release inhibitor. *J Clin Invest* 1984; 74: 2296–2299.

<sup>82</sup>Greenbaum CJ, Havel PJ, Taborsky GJ Jr, Klaff LJ. Intra-islet insulin permits glucose to directly suppress pancreatic A cell function. *J Clin Invest* 1991; 88: 767–773

<sup>83</sup>Gosmanov NR, Szoke E, Israelian Z et al. Role of the decrement in intra-islet insulin for the glucagon response to hypoglycemia in humans. *Diabetes Care* 2005; 28: 1124–1131.

<sup>84</sup>Israelian Z, Gosmanov NR, Szoke E et al. Increasing the decrement in insulin secretion improves glucagon responses to hypoglycemia in advanced type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28: 2691–2696.

fisiologica all'ipoglicemia, nella quale la riduzione della secrezione di insulina sembra essere il primo passo<sup>86</sup>. La contro-regolazione del glucosio nel diabete di tipo 2 non è comunemente squilibrata come lo è nel tipo 1, ma è stata evidenziata una lenta o ridotta risposta del glucagone all'ipoglicemia<sup>87</sup>. Non è chiaro come questa risposta inappropriata al basso glucosio sia mediata, ma il risultato funzionale è un'altra forma di insensibilità delle alfa cellule al glucosio. Pertanto è evidente che nei pazienti con diabete di tipo 2 la secrezione di glucagone è anormale, ma non è chiaro se si tratta di una caratteristica intrinseca dell'alfa cellula o se è il risultato di ulteriori anomalie. Molti scienziati hanno descritto anormali livelli di glucagone a digiuno in persone con alterata tolleranza al glucosio<sup>88,89,90</sup>, suggerendo una fase di disfunzione alfa e beta cellulare precoce negli stati pre-diabetici. Al contrario i pochi dati disponibili suggeriscono che la secrezione di glucagone non è significativamente disregolata negli adolescenti con diabete di tipo 2<sup>91,92</sup>, aumentando la possibilità che la disfunzione delle alfa cellule si sviluppi solo con l'invecchiamento. Da studi su uomini e animali emerge la prova che il glucagone svolge un ruolo importante nell'omeostasi del glucosio. Studi che utilizzano la somatostatina per inibire la secrezione alfa cellulare, hanno mostrato che il glucagone è responsabile del 40-50% della

---

<sup>85</sup>Raju B, Cryer PE. Loss of the decrement in intraislet insulin plausibly explains loss of the glucagon response to hypoglycemia in insulin-deficient diabetes: documentation of the intraislet insulin hypothesis in humans. *Diabetes* 2005; 54: 757–764

<sup>86</sup>Raju B, Cryer PE. Maintenance of the postabsorptive plasma glucose concentration: insulin or insulin plus glucagon? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289: E181–E186

<sup>87</sup>Gerich JE, Langlois M, Noacco C, Karam JH, Forsham PH. Lack of glucagon response to hypoglycemia in diabetes: evidence for an intrinsic pancreatic alpha cell defect. *Science* 1973; 182: 171–173.

<sup>88</sup>Ahren B, Larsson H. Impaired glucose tolerance (IGT) is associated with reduced insulin-induced suppression of glucagon concentrations. *Diabetologia* 2001; 44: 1998–2003

<sup>89</sup>Larsson H, Ahren B. Islet dysfunction in insulin resistance involves impaired insulin secretion and increased glucagon secretion in postmenopausal women with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 2000; 23: 650–657.

<sup>90</sup>Mitrakou A, Kelley D, Mookan M et al. Role of reduced suppression of glucose production and diminished early insulin release in impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 1992; 326: 22–29

<sup>91</sup>Elder DA, Prigeon RL, Wadwa RP, Dolan LM, D'Alessio DA. Beta-cell function, insulin sensitivity, and glucose tolerance in obese diabetic and nondiabetic adolescents and young adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 185–191.

<sup>92</sup>Tfayli H, Bacha F, Gungor N, Arslanian S. Islet cell antibody-positive versus-negative phenotypic type 2 diabetes in youth: does the oral glucose tolerance test distinguish between the two? *Diabetes Care* 2010; 33: 632–638

produzione epatica di glucosio a digiuno<sup>65,93,94</sup>. Coerentemente con questi risultati gli esperimenti che usano immuno-neutralizzazione del glucagone circolante, nei ratti<sup>95</sup>, e delezioni dei geni per il glucagone, nei topi<sup>96</sup>, sembrano mostrare un ruolo del glucagone nella regolazione della glicemia a digiuno. Questi risultati costituiscono le basi per un ampio consenso sul fatto che il glucagone ha sia effetti fisiologici che patogeni sul controllo del glucosio a digiuno. In soggetti sani, resi lievemente carenti in insulina grazie all'azione della somatostatina, la somministrazione di glucagone in quantità stimate per sostituirne i livelli a digiuno, causa iperglicemia<sup>85,97,98</sup>. In questi studi i risultati configurano il diabete di tipo 2 con una modesta riduzione del livello plasmatico di insulina e un modesto incremento di glucagone. Infatti la soppressione della secrezione ormonale insulare con somatostatina, in soggetti con diabete di tipo 2, causa una significativa riduzione del livello basale di produzione epatica di glucosio e questo effetto è amplificato quando l'insulina è riportata ai livelli basali<sup>65</sup>. Questi risultati implicano un coinvolgimento del glucagone nell'elevata produzione epatica di glucosio che caratterizza il diabete di tipo 2 e correlano con un contributo del glucagone nella patogenesi dell'iperglicemia a digiuno. I livelli plasmatici di glucagone non sono normalmente soppressi in soggetti con diabete di tipo 2 dopo carico orale di glucosio o pasti contenenti carboidrati. Pertanto, il glucosio prodotto dal fegato dopo un pasto, si mantiene vicino ai livelli a digiuno nei soggetti diabetici, piuttosto che andare incontro al brusco declino tipico dei soggetti non diabetici<sup>99</sup>. Nelle persone sane, la soppressione della secrezione del

---

<sup>93</sup>Del Prato S, Castellino P, Simonson DC, DeFronzo RA. Hyperglucagonemia and insulin-mediated glucose metabolism. *J Clin Invest* 1987; 79: 547–556.

<sup>94</sup>Liljenquist JE, Mueller GL, Cherrington AD et al. Evidence for an important role of glucagon in the regulation of hepatic glucose production in normal man. *J Clin Invest* 1977; 59: 369–374

<sup>95</sup>Brand CL, Jorgensen PN, Knigge U et al. Role of glucagon in maintenance of euglycemia in fed and fasted rats. *Am J Physiol* 1995; 269: E469–E477.

<sup>96</sup>Gelling RW, Du XQ, Dichmann DS et al. Lower blood glucose, hyper-glucagonemia, and pancreatic alpha cell hyperplasia in glucagon receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 1438–1443

<sup>97</sup>Lins PE, Wajngot A, Adamson U, Vranic M, Efendic S. Minimal increases in glucagon levels enhance glucose production in man with partial hypoinsulinemia. *Diabetes* 1983; 32: 633–636

<sup>98</sup>Ward WK, Best JD, Halter JB, Porte D Jr. Prolonged infusion of somatostatin with glucagon replacement increases plasma glucose and glucose turnover in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 58: 449–453.

<sup>99</sup>Rizza RA. Pathogenesis of fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes: implications for therapy. *Diabetes* 2010; 59: 2697–2707

glucagone dopo i pasti, è implicata nella commutazione del fegato, da organo deputato alla produzione di glucosio, ad organo deputato alla sua ricaptazione<sup>100</sup>. Molti studi forniscono informazioni circa il ruolo della soppressione del glucagone dopo i pasti, sulla glicemia post-prandiale e sull'importanza della secrezione insulinica in questo processo. Nei soggetti non diabetici a cui è stata somministrata somatostatina per inibire il rilascio di ormoni insulari, l'infusione di glucagone per mantenerne i livelli basali, causa un significativo aumento glicemico rispetto a quando il glucagone seguiva il normale declino post-prandiale<sup>101</sup>. Questo effetto era accentuato quando l'insulina veniva somministrata in un modello di diabete di tipo 2, con ritardato e diminuito aumento post-prandiale. Nel loro insieme i lavori di decenni provano che la persistenza del glucagone durante il periodo post-prandiale, provoca una relativa iperglicemia e nel contesto di una ridotta concentrazione plasmatica di insulina, la grandezza di questa risposta è di significato clinico. Mentre c'è un disaccordo di lunga data circa l'importanza dell'anormale funzionamento delle alfa e beta cellule nella patogenesi del diabete di tipo 2<sup>62</sup>. I livelli anormali di glucagone in circolo possono contribuire all'iperglicemia, ma entrambi gli ormoni insulari contribuiscono a questa condizione. Sulla base dei risultati sperimentali riguardanti il contributo del glucagone sull'errata omeostasi del glucosio nel diabete di tipo 2, sembra essere una strategia terapeutica ragionevole avere come obiettivo l'azione del glucagone. Recenti studi in modelli murini forniscono un ulteriore impulso per avere come obiettivo la via di segnale mediata dal recettore del glucagone, ma nonostante i risultati incoraggianti, emergono problemi quando la via di segnalazione del glucagone è sostanzialmente ridotta. Pertanto lo sviluppo di approcci farmacologici per bloccare il glucagone, come trattamento per il diabete di tipo 2, è complesso e questa strategia richiederà un attento bilancio tra effetti benefici e avversi. Sono state sviluppate due linee distinte di

---

<sup>100</sup>Holste LC, Connolly CC, Moore MC, Neal DW, Cherrington AD. Physiological changes in circulating glucagon alter hepatic glucose disposition during portal glucose delivery. *Am J Physiol* 1997; 273: E488–E496

<sup>101</sup>Shah P, Basu A, Basu R, Rizza R. Impact of lack of suppression of glucagon on glucose tolerance in humans. *Am J Physiol* 1999; 277: E283–E290



topi con delezione mirata del gene per il recettore del glucagone<sup>88,102</sup>. Entrambe hanno una riduzione del 30-40% del glucosio a digiuno ed un significativo miglioramento della tolleranza al glucosio. Inoltre topi knock-out per il recettore del glucagone (GlcR<sup>-/-</sup>) sono resistenti all'obesità indotta dalla dieta, all'insulino-resistenza, alla distruzione delle beta cellule con streptozotocina e all'iperglicemia durante grave insulinopenia<sup>103</sup>, tutte caratteristiche che sembrano avere un chiaro beneficio se estese ad un ambiente clinico. Un secondo interessante modello di riduzione dell'azione del glucagone sono topi con delezione del gene *Aristaless related homeobox (Arx)* mirata al pancreas<sup>104</sup>. *Arx* è un fattore di trascrizione che dirige i progenitori endocrini, alla linea alfa cellulare e in sua assenza questa linea non si sviluppa. Topi privi di *Arx* possiedono ridotta glicemia a digiuno e migliore tolleranza al glucosio passata l'età dello svezzamento. Inoltre sono resistenti all'iperglicemia indotta da streptozotocina, confermando in maniera importante le osservazioni derivanti da studi umani indicanti che l'assenza di glucagone mitiga, entro una certa misura, gli effetti di un'insulinopenia marcata. Sia in topi GlcR<sup>-/-</sup> che in *Arx*<sup>-/-</sup> (in stato di carenza cronica di glucagone) c'è evidenza di ridotta glicogenolisi e gluconeogenesi. Questi modelli murini sono coerenti con altri metodi di riduzione dell'azione del glucagone che sono stati applicati in roditori, come l'immuno-neutralizzazione del glucagone circolante, antagonisti del recettore del glucagone e oligonucleotidi antisense per il recettore del glucagone, ognuno dei quali abbassa il glucosio nel sangue<sup>63,105</sup>. I risultati provenienti da modelli animali provano il principio che l'interferenza di lunga durata con la via di segnalazione del glucagone, abbassa i livelli di glucosio nel sangue, sia a digiuno che dopo carico glicemico, riducendo la produzione di glucosio epatico e che questo può significare un'effettiva riduzione dell'iperglicemia. Nonostante

---

<sup>102</sup>Parker JC, Andrews KM, Allen MR, Stock JL, McNeish JD. Glycemic control in mice with targeted disruption of the glucagon receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 839–843

<sup>103</sup>Conarello SL, Jiang G, Mu J et al. Glucagon receptor knockout mice are resistant to diet-induced obesity and streptozotocin-mediated beta cell loss and hyperglycaemia. *Diabetologia* 2007; 50: 142–150.

<sup>104</sup>Hancock AS, Du A, Liu J, Miller M, May CL. Glucagon deficiency reduces hepatic glucose production and improves glucose tolerance in adult mice. *Mol Endocrinol* 2010; 24: 1605–1614

<sup>105</sup>Ali S, Drucker DJ. Benefits and limitations of reducing glucagon action for the treatment of type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296: E415–E421

l'evidenza che la riduzione dell'azione del glucagone è in grado di abbassare il livello di glucosio, ci sono preoccupazioni sollevate da alcuni modelli preclinici carenti nella via di segnalazione mediata dal recettore del glucagone. Topi  $\text{GlcaR}^{-/-}$  e animali trattati con oligonucleotidi antisenso per il recettore del glucagone, sviluppano un'importante iperplasia delle alfa cellule e un'aumentata produzione di peptidi derivanti dal proglucagone<sup>88,106</sup>. L'iperplasia delle alfa cellule sembra esser reversibile ripristinando la segnalazione dei recettori epatici del glucagone<sup>98</sup>. Tuttavia, oltre all'espansione delle cellule endocrine, gli animali con  $\text{GlcaR}^{-/-}$  sembrano avere anche un aumento della crescita delle cellule esocrine che si riflette in un aumento del peso totale del pancreas<sup>88,94</sup>. Inoltre sembrano esserci riduzioni della capacità del fegato  $\text{GlcaR}^{-/-}$ , di ossidare lipidi con lo sviluppo in alcuni casi di steatosi epatica<sup>107</sup>. Lavori più recenti sollevano la possibilità che la mancanza del segnale mediato da  $\text{GlcaR}$ , promuova la suscettibilità degli epatociti al danno tossico<sup>108</sup>. Anche se nessuno di questi risultati vede come obiettivo terapeutico l'eliminazione della via di segnalazione del glucagone, essi suggeriscono che la riduzione completa, o quasi, della via mediata da  $\text{GlcaR}$  potrebbe interferire con importanti funzioni non connesse direttamente alla regolazione del glucosio. Infine è importante ricordare che il glucagone ricopre un ruolo centrale nella risposta protettiva all'ipoglicemia e in nessuno dei modelli animali la diminuita azione del glucagone è stata rigorosamente testata per la contro-regolazione del glucosio. Ci sono pochi dati a disposizione per quanto riguarda il blocco dell'azione del glucagone negli uomini. Un antagonista non peptidico, specifico per il recettore del glucagone, (BAY27-9955) non influenza i livelli di glucosio a digiuno in soggetti sani sottoposti al test<sup>109</sup>, ma BAY27-9955 non è stato ulteriormente testato quindi non è chiaro che effetto abbia in soggetti

---

<sup>106</sup>Sloop KW, Cao JX, Siesky AM et al. Hepatic and glucagon-like peptide-1-mediated reversal of diabetes by glucagon receptor antisense oligonucleotide inhibitors. *J Clin Invest* 2004; 113: 1571–1581

<sup>107</sup>Longuet C, Sinclair EM, Maida A et al. The glucagon receptor is required for the adaptive metabolic response to fasting. *Cell Metab* 2008; 8: 359–371.

<sup>108</sup>Sinclair EM, Yusta B, Streutker C et al. Glucagon receptor signaling is essential for control of murine hepatocyte survival. *Gastroenterology* 2008; 135: 2096–2106.

<sup>109</sup>Petersen KF, Sullivan JT. Effects of a novel glucagon receptor antagonist (Bay 27-9955) on glucagon-stimulated glucose production in humans. *Diabetologia* 2001; 44: 2018–2024

con iperglicemia a digiuno o iperglucagonemia endogena. Un secondo antagonista del recettore del glucagone blocca la produzione di cAMP, stimolata dal glucagone, e la glicogenolisi in colture primarie di epatociti umani<sup>110</sup>, ma non ci sono informazioni su questo composto nell'uso clinico. L'approccio farmacologico che riproduce meglio il caso sperimentale del topo GlcaR<sup>-/-</sup>, è quello che vede l'uso di antagonisti del recettore del glucagone i quali sembrerebbero avere un potenziale notevole come agenti ipoglicemizzanti. D'altro canto però richiedono un'attenta valutazione per i possibili effetti avversi, emersi nel modello animale GlcaR<sup>-/-</sup>, come l'iperplasia delle alfa cellule, la steatosi epatica e la contro-regolazione del glucosio. Dato l'avanzamento intermittente di questa classe di farmaci, sembra che lo sviluppo di questo settore sarà impegnativo. Esistono efficaci farmaci antidiabetici che inibiscono la secrezione di glucagone e sia l'insulina esogena che le sulfaniluree la inibiscono almeno parzialmente<sup>111,112</sup>, ma non è chiaro quanto ciò contribuisca alla loro efficacia terapeutica. Tuttavia nuove classi di farmaci, antagonisti del recettore del GLP-1 e inibitori della DPP-4, si pensa lavorino abbassando, in parte, i livelli plasmatici di glucagone. Il GLP-1 è un prodotto derivante dal proglucagone che ha circa il 50% di omologia con il glucagone stesso<sup>113</sup>. Tuttavia il GLP-1 è sintetizzato principalmente nell'intestino con una minima quantità prodotta nelle alfa cellule. Il GLP-1 si lega ad uno specifico recettore che è diverso, ma correlato, con il GlcaR e c'è una minima cross-reattività tra queste due coppie recettore-ligando. A differenza del glucagone, il GLP-1 agisce abbassando i livelli ematici di glucosio attraverso molti meccanismi che includono la stimolazione della secrezione dell'insulina e la riduzione del glucagone plasmatico. Il GLP-1 viene rapidamente inattivato dalla proteasi ubiquitaria DPP-4, così l'emivita del peptide bioattivo è di 1-2 minuti. Come inibitori della DPP-4 sono disponibili, per via orale, farmaci contenenti piccole molecole capaci di prolungare l'attività di GLP-1 e di altri

---

<sup>110</sup>Parker JC, McPherson RK, Andrews KM et al. Effects of skyrin, a receptor-selective glucagon antagonist, in rat and human hepatocytes. *Diabetes* 2000; 49: 2079–2086

<sup>111</sup>Raskin P, Aydin I, Unger RH. Effect of insulin on the exaggerated glucagon response to arginine stimulation in diabetes mellitus. *Diabetes* 1976; 25: 227–229

<sup>112</sup>Pfeifer MA, Halter JB, Judzewitsch RG et al. Acute and chronic effects of sulfonylurea drugs on pancreatic islet function in man. *Diabetes Care* 1984; 7 (Suppl 1): 25–34.

<sup>113</sup>Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metab* 2006; 3: 153–165

peptidi metabolizzati dalla DPP-4. La somministrazione esogena di GLP-1, così come di altri peptidi, riduce i livelli di glucagone nel plasma, ma ci sono ancora alcune domande sul meccanismo con cui ciò si verifica, dal momento che molti studi non hanno localizzato il recettore del GLP-1 nelle alfa cellule<sup>114,115</sup>. Spiegazioni alternative, quali la mediazione indiretta attraverso la somatostatina pancreatica o attraverso la regolazione neurale, sono state offerte a tale supporto. Studi che utilizzano antagonisti del recettore del GLP-1 hanno dimostrato che la loro somministrazione porta ad un aumento sia del glucagone, che delle concentrazioni di glucosio a digiuno<sup>116,117</sup>, indicando che il controllo della secrezione alfa cellulare è una funzione fisiologica del GLP-1. Inoltre un recente lavoro che utilizza la somatostatina per bloccare il rilascio di ormone insulare e infusioni esogene, per uguagliare i livelli osservati dopo somministrazione di GLP-1, suggeriscono che gli effetti dell'abbassamento del glucagone e della stimolazione dell'insulina sono più o meno equivalenti nel mantenere la glicemia a digiuno<sup>118</sup>. È degno di nota che la somministrazione di quantità farmacologiche di GLP-1 a soggetti con iperglicemia dovuta a diabete di tipo 1 (con funzione beta cellulare minima)<sup>119</sup>, ha causato un calo della glicemia coincidente con una diminuzione del 40-50% del glucagone nel plasma. Questo studio è stato preso come prova che la soppressione del glucagone costituisce una porzione significativa dell'attività ipoglicemizante del GLP-1 nel diabete. Inoltre durante l'ipoglicemia indotta da insulina, il GLP-1 non interferisce con il rilascio di

---

<sup>114</sup>Nauck MA, Kleine N, Orskov C, Holst JJ, Willms B, Creutzfeldt W. Normalization of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 1993; 36: 741–744.

<sup>115</sup>Gromada J, Rorsman P. New insights into the regulation of glucagon secretion by glucagon-like peptide-1. *Horm Metab Res* 2004; 36: 822–829.

<sup>116</sup>D'Alessio DA, Vogel R, Prigeon R et al. Elimination of the action of glucagon-like peptide 1 causes an impairment of glucose tolerance after nutrient ingestion by healthy baboons. *J Clin Invest* 1996; 97: 133–138.

<sup>117</sup>Schirra J, Sturm K, Leicht P, Arnold R, Goke B, Katschinski M. Exendin(9-39) amide is an antagonist of glucagon-like peptide-1(7-36)amide in humans. *J Clin Invest* 1998; 101: 1421–1430

<sup>118</sup>Hare KJ, Vilsboll T, Asmar M, Deacon CF, Knop FK, Holst JJ. The glucagonostatic and insulinotropic effects of glucagon-like peptide 1 contribute equally to its glucose-lowering action. *Diabetes* 2010; 59: 1765–1770.

<sup>119</sup>Creutzfeldt WO, Kleine N, Willms B, Orskov C, Holst JJ, Nauck MA. Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I(7-36) amide in type I diabetic patients. *Diabetes Care* 1996; 19: 580–586.

glucagone<sup>120</sup>, dimostrando che le azioni del GLP-1 sulle alfa cellule dipendono dal glucosio e sono anche visibili nelle azioni di questo peptide sulle beta cellule. Ci sono svariati agonisti del recettore del GLP-1 attualmente in uso come farmaci per il diabete di tipo 2. Exenatide e Liraglutide hanno raggiunto un uso moderato, entrambi riducono la glicemia e abbassano l'emoglobina glicata nei soggetti diabetici con concomitante miglioramento della secrezione di insulina e riduzione di glucagone nel plasma<sup>121</sup>. In modo simile al GLP-1 nativo, l'Exenatide riduce le concentrazioni di glucagone in soggetti con diabete di tipo 1<sup>122</sup>, un effetto che sembra spiegare gran parte dell'abbassamento della glicemia in questi soggetti. Tuttavia l'importanza relativa dell'abbassamento del glucagone, dell'insulino-tropismo o degli effetti extra-insulari degli agonisti del recettore del GLP-1 sul controllo glicemico non è del tutto chiara e in realtà è un difficile problema sperimentale da risolvere attraverso studi sull'uomo. La somministrazione acuta o cronica di Exenatide e Liraglutide riduce la glicemia a digiuno o post prandiale, spesso con cambiamenti modesti della concentrazione plasmatica di insulina e glucagone. L'interpretazione dei livelli plasmatici di ormoni insulari, a vari gradi di iperglicemia, consente un giudizio qualitativo sul miglioramento della funzione insulare. Tuttavia effettuare valutazioni quantitative richiede approcci più sofisticati. Modelli matematici sono stati utilizzati per valutare la secrezione insulinica e fornire una visione più chiara dell'effetto di Exenatide, per migliorare la sensibilità della beta cellula al glucosio<sup>123</sup>. Allo stesso modo, la somministrazione di Liraglutide durante un picco glicemico, ha permesso una

---

<sup>120</sup>Nauck MA, Heimesaat MM, Behle K et al. Effects of glucagon-like peptide 1 on counterregulatory hormone responses, cognitive functions, and insulin secretion during hyperinsulinemic, stepped hypoglycemic clamp experiments in healthy volunteers. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1239–1246

<sup>121</sup>Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 2006; 368: 1696–1705.

<sup>122</sup>Dupre J, Behme MT, McDonald TJ. Exendin-4 normalized postcibalglycemic excursions in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3469–3473

<sup>123</sup>Mari A, Nielsen LL, Nanayakkara N, DeFronzo RA, Ferrannini E, Halseth A. Mathematical modeling shows exenatide improved beta-cell function in patients with type 2 diabetes treated with metformin or metformin and a sulfonylurea. *Horm Metab Res* 2006; 38: 838–844.

simile conclusione<sup>124</sup>. Tuttavia, poiché i metodi per valutare la secrezione di glucagone in vivo non sono così avanzati come quelli per studiare la secrezione di insulina, gli effetti degli agonisti del recettore del GLP-1 sull'alfa cellula tardano ad esser valutati. Pertanto allo stato attuale sembra chiaro che farmaci come Exenatide e Liraglutide riducono il glucagone plasmatico, ma l'importanza generale di questo effetto per il controllo glicemico nel diabete può esser solo presunta. Anche gli inibitori della DPP-4 sono in uso per il trattamento del diabete. Sitagliptin, Saxagliptin e Vildagliptin sono disponibili da alcuni anni ed ora sono comunemente utilizzati. La DPP-4 agisce su molti peptidi naturali, mentre gli effetti degli inibitori della DPP-4 per migliorare i livelli di glucosio nel sangue in persone con diabete di tipo 2, sono stati generalmente attribuiti al GLP-1. Coerentemente con questa ipotesi, questi farmaci stimolano la secrezione di insulina e riducono il glucagone plasmatico, come facevano il GLP-1 esogeno o gli agonisti del recettore del GLP-1. Poiché i cambiamenti nella concentrazione plasmatica di glucagone sono spesso più pronunciati rispetto ai cambiamenti dell'insulina, durante l'uso cronico di inibitori della DPP-4<sup>125</sup> vi è una certa tendenza ad attribuire come effetto farmacologico predominante di questo composto, l'inibizione delle alfa cellule. Tuttavia, gli stessi problemi di interpretazione ottenuti con gli inibitori della DPP-4, con Exenatide e Liraglutide, come i livelli plasmatici di insulina e glucagone, devono esser visti nel contesto di bassa glicemia. Una recente evidenza supporta un chiaro effetto del Vildagliptin nel migliorare la secrezione di insulina, così come nel ridurre il glucagone nel plasma<sup>126</sup>, cosa che non supporta il concetto che gli inibitori della DPP-4 hanno come principale obiettivo il glucagone. Tuttavia ci sono molti dati che fanno pensare che il trattamento farmacologico con questi composti, come con agonisti del recettore del GLP-1, sia associato con livelli plasmatici di glucagone

---

<sup>124</sup>Chang AM, Jakobsen G, Sturis J et al. The GLP-1 derivative NN2211 restores beta-cell sensitivity to glucose in type 2 diabetic patients after a single dose. *Diabetes* 2003; 52: 1786–1791.

<sup>125</sup>Ahren B, Landin-Olsson M, Jansson PA, Svensson M, Holmes D, Schweizer A. Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels, and reduces glucagon levels in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2078–2084.

<sup>126</sup>Balas B, Baig MR, Watson C et al. The dipeptidyl peptidase IV inhibitor vildagliptin suppresses endogenous glucose production and enhances islet function after single-dose administration in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 1249–1255

significativamente più bassi e l'evidenza della riduzione della glicemia sostiene il ruolo degli inibitori della DPP-4, nell'influenzare la sensibilità delle alfa cellule al glucosio. In sintesi, mentre non vi sono progressi significativi nello sviluppo di farmaci specificamente mirati alla via di segnale del glucagone da utilizzare nel diabete, ci sono prove che l'abbassamento del glucagone nel plasma ha effetti benefici sul controllo della glicemia in questi pazienti. Comprendere l'entità degli effetti della soppressione del glucagone da parte degli inibitori della DPP-4 e degli agonisti del recettore per il GLP-1, sull'abbassamento del glucosio, fornirebbe una visione più chiara circa il potenziale riguardo al glucagone come obiettivo terapeutico. Il ruolo del glucagone nella regolazione della glicemia continua ad essere dibattuto<sup>62,78</sup>, mentre la maggior parte delle evidenze supportano la secrezione delle alfa cellule nella regolazione dell'omeostasi del glucosio post prandiale e a digiuno. C'è un consenso generale riguardo le concentrazioni plasmatiche di glucagone, che sono elevate nei soggetti diabetici e non sono normalmente responsive alla regolazione usuale. Dati sperimentali in animali e uomo implicano il segnale del glucagone nell'iperglicemia e suggeriscono che la normalizzazione della secrezione di glucagone, o anche la soppressione farmacologica, potrebbero avere potenti effetti sulla glicemia. Sono attualmente disponibili terapie che inibiscono la secrezione di glucagone, agonisti del recettore del GLP-1 e inibitori della DPP-4 che supportano questa ipotesi. Tuttavia avere come obiettivo terapeutico il sistema di segnale GlcR-glucagone, per ora, è di difficile realizzazione. Per questo sembra necessaria una maggiore comprensione del sistema, da parte della ricerca di base e clinica, per far avanzare quest'area potenzialmente utile<sup>127</sup>.

## **1.9 Diabete di tipo 2 e IL-6**

Le persone che progrediscono verso il diabete di tipo 2 presentano un basso grado di infiammazione anni prima rispetto alla comparsa della malattia. Questa

---

<sup>127</sup> D'Alessio D. The role of dysregulated glucagon secretion in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2011 Oct;13 Suppl 1:126-32. doi: 10.1111/j.1463-1326.2011.01449.x. Review.

infiammazione è stata proposta come una delle cause responsabili dell'insorgenza della patologia diabetica. Mediatori dell'infiammazione come il fattore di necrosi tumorale  $\alpha$ , l'interleuchina (IL)  $1\beta$ , IL-6, IL-18 e alcune chemochine sono stati proposti come possibili concause implicate nell'insorgenza sia del diabete di tipo 1 che in quello di tipo 2. In particolare l'IL-6, oltre alle sue azioni immunomodulanti, sembra influenzare l'omeostasi del glucosio, direttamente e indirettamente, agendo su cellule muscolari scheletriche, adipociti, epatociti, cellule beta pancreatiche e cellule neuroendocrine. Da un recente studio è emerso che somministrando IL-6, o inducendone un innalzamento mediante attività fisica, è possibile ottenere la secrezione di GLP-1 da parte delle cellule L intestinali ed alfa pancreatiche, con conseguente secrezione di insulina e miglioramento della glicemia<sup>128</sup>. L'IL-6 sembra incrementare la produzione di GLP-1 attraverso un aumento di espressione di proglucagone e PC1/3, mentre quando viene neutralizzata si ottiene un aumento della glicemia e una riduzione del GLP-1 pancreatico<sup>120</sup>. Tutto ciò fa pensare che l'IL-6 interconnetta i tessuti insulino-sensibili, le cellule L intestinali e le cellule alfa pancreatiche in un ciclo endocrino, precedentemente non identificato, che permette l'adattamento di questi distretti alle variazioni della domanda di insulina<sup>120</sup>. Questi risultati suggeriscono un utilizzo di farmaci capaci di modulare questo ciclo, come possibile terapia del diabete di tipo 2. Nell'ultimo decennio l'interesse per il ruolo dell'infiammazione in una vasta gamma di malattie non comunemente considerate come immuno-mediate, ha favorito studi dai quali è emerso che i mediatori dell'infiammazione possono, non solo esser indicatori di disfunzioni metaboliche nel diabete di tipo 2, ma contribuiscono direttamente alla disfunzione delle beta cellule e all'insulino-resistenza<sup>129,130</sup>. Recentemente un numero sempre maggiore di evidenze è a favore

---

<sup>128</sup>Ellingsgaard H, Hauselmann I, Schuler B, Habib AM, Baggio LL, Meier DT, Eppler E, Bouzakri K, Wueest S, Muller YD, Hansen AM, Reinecke M, Konrad D, Gassmann M, Reimann F, Halban PA, Gromada J, Drucker DJ, Gribble FM, Ehse JA, Donath MY. Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells. *Nat Med*. 2011 Oct 30;17(11):1481-9.

<sup>129</sup>Kolb H, Mandrup-Poulsen T: An immune origin of type 2 diabetes. *Diabetologia* 48:1038 – 1050, 2005

<sup>130</sup>Pickup JC: Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27:813– 823, 2004



di un possibile ruolo dei meccanismi immuno-correlati nella patogenesi del diabete di tipo 2, sia per quanto riguarda il cedimento progressivo e la morte delle beta cellule, sia per la resistenza periferica all'insulina. L'IL-6 è una citochina pleiotropica con un impatto chiave sia nell'immuno-regolazione che in eventi non immunologici, nella maggior parte dei tipi cellulari e tissutali al di fuori del sistema immunitario<sup>131</sup>. Un gran numero di dati epidemiologici, genetici, sui roditori e sull'uomo, in vivo e in vitro hanno indagato il possibile ruolo di azione/mancanza di azione dell'IL-6 nella patogenesi alla base dell'obesità, dell'insulino-resistenza, della distruzione delle beta cellule, nel diabete di tipo 1 e di tipo 2. Gli studi suggeriscono che l'IL-6, nel diabete, ha sia azioni protettive che patogenetiche. L'IL-6 deriva da una famiglia di citochine che include anche l'IL-11, l'oncostatina M, il fattore inibente la leucemia, il fattore neurotrofico ciliare, la cardiotropina 1 e la citochina cardiotropina-simile. Queste citochine sono caratterizzate dal loro uso comune della gp130 (chiamata anche IL-6R $\beta$  o CD130), subunità di segnalazione del recettore. Esistono diversi polimorfismi a carico del gene codificante l'IL-6<sup>132,133</sup> e molti studi hanno valutato l'associazione con patologie quali il diabete di tipo 1, il diabete di tipo 2 e l'insulino-resistenza. La proteina IL-6 umana è costituita da 212 aminoacidi con un peptide segnale di 27 aminoacidi e presenta due siti di potenziale glicosilazione al terminale amminico<sup>123</sup>. Il peso molecolare varia da 21 a 28 kDa. Il recettore per l'IL-6 è composto da 449 aminoacidi ma solo 82 compongono il dominio citoplasmatico. Si trova in una forma legata alla membrana e in almeno due forme solubili generate dal clivaggio proteolitico della prima o da splicing alternativo. L'IL-6 induce la via di segnalazione in tutte le cellule esprimenti il recettore ubiquitario

---

<sup>131</sup>Kamimura D, Ishihara K, Hirano T: IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 149:1–38, 2003

<sup>132</sup>Kristiansen OP, Nolsøe RL, Larsen L, Gjesing AMP, Johannesen J, Larsen ZM, Lykkesfeldt AE, Karlsen AE, Pociot F, Mandrup-Poulsen T, DIEGG, DSGD: Association of a functional 17beta-estradiol sensitive IL6-174G/C promoter polymorphism with early onset type 1 diabetes in females. *Hum Mol Genet* 12:1101–1110, 2003

<sup>133</sup>Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P: The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102:1369 – 1376, 1998

gp130. La risposta cellulare all'IL-6 dipende dalla via di segnalazione che prevale nella singola cellula<sup>123</sup>, per questo l'esito biologico risultante è complesso e può provocare diversi eventi fisiologici come la proliferazione cellulare, la differenziazione, la sopravvivenza e l'apoptosi. Diverse tipologie di cellule producono IL-6 tra cui la maggior parte delle cellule del sistema immunitario, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce o striate, adipociti, beta cellule pancreatiche, epatociti, cellule microgliali e astrociti<sup>123</sup>. Inizialmente si pensava che l'IL-6 fosse una citochina pro-infiammatoria con effetti principalmente all'interno del sistema immunitario, ma si è dimostrato troppo semplicistico<sup>123</sup>. L'IL-6 è coinvolta sia nella risposta immunitaria innata che in quella adattativa, sia nell'amplificazione che nella protezione contro l'infiammazione<sup>123,134</sup>. Per questo una regolazione inadeguata dell'IL-6 può giocare un ruolo protettivo o dannoso in malattie immuno-mediate antigene-specifico e in malattie in cui l'IL-6, o altri fattori infiammatori, causano un basso grado di infiammazione (obesità e diabete di tipo 2) per le quali rischia di essere coinvolta nella patogenesi<sup>121-123,126</sup>. Sono stati effettuati diversi studi genetici per quanto riguarda la relazione tra IL-6 e diabete di tipo 1 e 2. Attuando scansioni su tutto il genoma per i loci di suscettibilità al diabete di tipo 2, il locus per l'IL-6 non è stato collegato a tale patologia, mentre il gene per il recettore dell'IL-6 (IL-6R) si associa ad una regione ripetuta collegata al diabete di tipo 2<sup>135,136</sup>. Una caratteristica comune ai due tipi di diabete è una parziale o assoluta mancanza di produzione di insulina per il mantenimento della normale omeostasi del glucosio. Siccome nel diabete di tipo 2 c'è un danno progressivo a carico delle beta cellule che porta a una riduzione della loro massa per incremento dell'apoptosi<sup>137</sup>, si è pensato che l'IL-6

---

<sup>134</sup>Jones SA, Horiuchi S, Topley N, Yamamoto N, Fuller GM: The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J* 15:43–58, 2001

<sup>135</sup>Wang H, Zhang Z, Chu W, Cooper JJ, Elbein SC: Molecular screening and association analyses of the interleukin 6 receptor gene variants with type 2 diabetes, diabetic nephropathy, and insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1123–1129, 2005

<sup>136</sup>Hamid YH, Urhammer SA, Jensen DP, Glumer C, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Hansen T, Pedersen O: Variation in the interleukin-6 receptor gene associates with type 2 diabetes in Danish whites. *Diabetes* 53:3342–3345, 2004

<sup>137</sup>Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC:  $\beta$ -Cell deficit and increased  $\beta$ -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52:102–110, 2003

potesse contribuire a questo processo, però manca una prova diretta del suo ruolo dannoso sull'uomo. L'effetto citotossico sulle beta cellule non è stato dimostrato in esperimenti in vivo e uno studio indica addirittura un effetto protettivo in cellule di topo. Nel loro insieme i dati in vivo suggeriscono che l'IL-6 può giocare un ruolo patogenetico sul livello di infiammazione dell'isola pancreatica, ma da sola non è in grado di indurre o promuovere la distruzione delle beta cellule, per cui sono necessari ulteriori fattori come ad esempio ulteriori citochine pro-infiammatorie. La sovraespressione di IL-6, specialmente a livello delle beta cellule, promuove l'infiammazione dell'isolotto pancreatico, ma è insufficiente a favorire la comparsa di diabete nei ceppi non diabetici<sup>138</sup>. Quindi ulteriori fattori sono necessari per l'instaurarsi della patologia diabetica. Questi studi in vivo sono contrari ad un effetto diretto e negativo della sola IL-6 e sono supportati anche da studi di sovraespressione del gene per l'IL-6<sup>130</sup>. Quindi l'apoptosi è la causa principale di morte cellulare a livello del pancreas producendo una riduzione delle beta cellule nel diabete di tipo 2<sup>129</sup>. Studi in vitro su isolotti pancreatici e beta cellule non hanno dimostrato un effetto apoptotico della sola IL-6, quindi non ci sono prove circa il suo ruolo come fattore pro-apoptotico<sup>130</sup>. È stato dimostrato che un basso grado di infiammazione precede lo sviluppo del diabete di tipo 2 e potrebbe essere un fattore di rischio. In più cambiamenti nello stile di vita e cure mediche che abbassano questo stato infiammatorio, riducono il rischio di sviluppo futuro del diabete di tipo 2<sup>121,122</sup>, suggerendo che l'infiammazione può svolgere un ruolo nella patogenesi di questa malattia, ma il meccanismo non è chiaro. L'associazione tra IL-6 e diabete di tipo 2 potrebbe semplicemente riflettere un tentativo di contrastare l'infiammazione di basso grado indotta da altri mediatori dell'infiammazione<sup>130</sup>. Nel diabete di tipo 2, oltre al calo della massa beta cellulare per aumentata apoptosi, vi è una compromissione della produzione e della secrezione dell'insulina<sup>139</sup>. Studi in vitro hanno valutato l'impatto dell'IL-6 sulle isole pancreatiche senza però dimostrarne un effetto sulla produzione e sul rilascio dell'insulina, ma la maggior parte degli studi nei roditori indicano che

---

<sup>138</sup>Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? Diabetes 54 Suppl 2: S114–S124, 2005.

<sup>139</sup>Reaven GM: Role of insulin resistance in human disease. Diabetes 37:1595–1607, 1988

l'IL-6 inibisce la secrezione di insulina glucosio-stimolata<sup>140,141,142,143,144,145</sup>. Nonostante l'incoerenza con i dati in vitro, questi studi non escludono che l'IL-6 possa influenzare il rilascio di insulina in determinate condizioni, come alte concentrazioni di glucosio, alti livelli di IL-6 o in sinergia con altri mediatori dell'infiammazione. Il ruolo dell'IL-6 nell'insulino-resistenza è controverso<sup>146</sup>. L'IL-6 è rilasciata in vivo dagli adipociti fino al 35% del livello basale<sup>147</sup> spiegando almeno in parte la correlazione positiva tra i suoi livelli sierici e l'obesità<sup>148,149</sup>. Non è chiaro se l'IL-6 agisce come molecola pro- o anti-infiammatoria a livello del tessuto adiposo. Alcuni studi sono a favore dell'IL-6 come causa di insulino-resistenza negli adipociti, però queste osservazioni hanno bisogno di conferma in colture cellulari primarie<sup>130</sup>. Tuttavia, non ci sono prove a favore del fatto che l'IL-6 causi insulino-resistenza, ma piuttosto sembra una

---

<sup>140</sup>Southern C, Schulster D, Green IC: Inhibition of insulin secretion from rat islets of Langerhans by interleukin-6: an effect distinct from that of interleukin-1. *Biochem J* 272:243–245, 1990

<sup>141</sup>Sandler S, Bendtzen K, Eizirik DL, Welsh M: Interleukin-6 affects insulin secretion and glucose metabolism of rat pancreatic islets in vitro. *Endocrinology* 126:1288–1294, 1990

<sup>142</sup>Eizirik DL, Sandler S, Welsh N, Cetkovic-Cvrlje M, Nieman A, Geller DA, Pipeleers DG, Bendtzen K, Hellerstrom C: Cytokines suppress human islet function irrespective of their effects on nitric oxide generation. *J Clin Invest* 93:1968–1974, 1994

<sup>143</sup>Wadt KA, Larsen CM, Andersen HU, Nielsen K, Karlens AE, Mandrup-Poulsen T: Ciliary neurotrophic factor potentiates the  $\beta$ -cell inhibitory effect of IL-1 in rat pancreatic islets: association with increased nitric oxide synthesis and increased expression of inducible nitric oxide synthase. *Diabetes* 47:1602–1608, 1998

<sup>144</sup>Choi SE, Choi KM, Yoon IH, Shin JY, Kim JS, Park WY, Han DJ, Kim SC, Ahn C, Kim JY, Hwang ES, Cha CY, Szot GL, Yoon KH, Park CG: IL-6 protects pancreatic islet beta cells from pro-inflammatory cytokines-induced cell death and functional impairment in vitro and in vivo. *Transpl Immunol* 13:43–53, 2004

<sup>145</sup>Campbell IL, Cutri A, Wilson A, Harrison LC: Evidence for IL-6 production by and effects on the pancreatic beta-cell. *J Immunol* 143:1188–1191, 1989

<sup>146</sup>Carey AL, Febbraio MA: Interleukin-6 and insulin sensitivity: friend or foe? *Diabetologia* 47:1135–1142, 2004

<sup>147</sup>Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppack SW: Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4196–4200, 1997

<sup>148</sup>Pedersen M, Bruunsgaard H, Weis N, Hendel HW, Andreassen BU, Eldrup E, Dela F, Pedersen BK: Circulating levels of TNF-alpha and IL-6-relation to truncal fat mass and muscle mass in healthy elderly individuals and in patients with type-2 diabetes. *Mech Ageing Dev* 124:495–502, 2003

<sup>149</sup>Weiss R, Dziura J, Burgert TS, Tamborlane WV, Taksali SE, Yeckel CW, Allen K, Lopes M, Savoye M, Morrison J, Sherwin RS, Caprio S: Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med* 350:2362–2374, 2004

semplice correlazione<sup>138</sup>. Gli studi che indagano il ruolo dell'IL-6 hanno valutato gli effetti a breve termine, ma probabilmente la risposta è diversa quando la stimolazione è a lungo termine. Il muscolo scheletrico è il più grande dei tessuti insulino-sensibili e contribuisce a più del 90% dello smaltimento del glucosio in individui sani<sup>131</sup>. Nonostante questo, ci sono davvero pochi studi che valutano l'azione dell'IL-6 su questo tessuto. Durante l'esercizio fisico grandi quantità di IL-6 vengono rilasciate dal tessuto muscolare<sup>150,151</sup> per una regolazione dell'omeostasi del glucosio durante l'esercizio, ma da un punto di vista fisiologico sembra irrazionale che un lavoro muscolare rilasci un fattore che inibisce il segnale dell'insulina quando il muscolo ha bisogno dell'azione dell'insulina per il metabolismo aerobico del glucosio. Pertanto non è chiaro se l'IL-6 provochi insulino-resistenza nel muscolo scheletrico<sup>143,152,153,154</sup> e ci sono prove limitate su stimolazioni a lungo termine favorevoli a tale ipotesi<sup>130</sup>. Tuttavia l'effetto dell'IL-6 sulla sensibilità all'insulina può dipendere dalla concentrazione e dalla durata dell'esposizione<sup>130</sup>. Per quanto riguarda gli epatociti, è evidente la capacità dell'IL-6 di ridurre la sensibilità all'insulina. L'IL-6 influisce, direttamente o indirettamente, anche su altri organi importanti per l'omeostasi del glucosio nel diabete di tipo 2, compresi i centri cerebrali coinvolti nella regolazione della spesa energetica e l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene<sup>123</sup>, quest'ultimo però non ha suscitato grande interesse. L'attenzione è stata focalizzata sull'azione dell'IL-6 sui centri cerebrali coinvolti nella regolazione della spesa energetica e sul conseguente

---

<sup>150</sup>Febbraio MA, Hiscock N, Sacchetti M, Fischer CP, Pedersen BK: Interleukin-6 is a novel factor mediating glucose homeostasis during skeletal muscle contraction. *Diabetes* 53:1643–1648, 2004

<sup>151</sup>Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, Wolsk-Petersen E, Febbraio M: The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor? *Proc Nutr Soc* 63:263–267, 2004

<sup>152</sup>Kim HJ, Higashimori T, Park SY, Choi H, Dong J, Kim YJ, Noh HL, Cho YR, Cline G, Kim YB, Kim JK: Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes* 53:1060–1067, 2004

<sup>153</sup>Rieusset J, Bouzakri K, Chevillotte E, Ricard N, Jacquet D, Bastard JP, Laville M, Vidal H: Suppressor of cytokine signaling 3 expression and insulin resistance in skeletal muscle of obese and type 2 diabetic patients. *Diabetes* 53:2232–2241, 2004

<sup>154</sup>Klover PJ, Zimmers TA, Koniaris LG, Mooney RA: Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice. *Diabetes* 52:2784–2789, 2003

rischio di sviluppare obesità e diabete di tipo 2<sup>155</sup>. In conclusione diverse evidenze indicano che l'IL-6 colpisce i centri del SNC coinvolti nella regolazione della spesa energetica. Bassi livelli e bassa produzione di IL-6 da parte del SNC possono contribuire allo sviluppo dell'obesità e alla conseguente insulino-resistenza<sup>130</sup>. Ci sono prove che i livelli circolanti di IL-6 sono elevati già anni prima dell'insorgenza del diabete di tipo 2, ma come ciò sia coinvolto nel meccanismo patogenetico è ancora una questione aperta. Non ci sono prove per un ruolo indipendente dell'IL-6 nell'alterazione della funzione delle beta cellule e nella progressiva apoptosi<sup>130</sup>. L'esposizione cronica e acuta all'IL-6 causa alterazione del segnale dell'insulina in epatociti, sia in vivo che ex vivo. Ci sono prove principalmente a sostegno del ruolo dell'IL-6 nell'alterazione del segnale insulinico in adipociti in vitro, ma ciò resta da dimostrare in vivo. A lungo termine una stimolazione con IL-6 non sembra causare insulino-resistenza nel muscolo scheletrico, ma a conferma sono richieste ulteriori indagini. Inoltre, un'alterata azione dell'IL-6 nei centri del SNC coinvolti nella regolazione energetica può essere causa di obesità e quindi di insulino-resistenza, ma ciò ha bisogno di ulteriori conferme. L'IL-6 può quindi contribuire allo sviluppo del diabete di tipo 1 e di tipo 2, ma probabilmente non è né necessaria né sufficiente<sup>130</sup>.

---

<sup>155</sup>Wallenius K, Jansson JO, Wallenius V: The therapeutic potential of interleukin-6 in treating obesity. *Expert Opin Biol Ther* 3:1061–1070, 2003

## **Capitolo 2. Scopo della tesi**

Poiché sono scarse o assenti le informazioni presenti in letteratura riguardo al meccanismo di sintesi e secrezione del GLP-1 da parte delle alfa cellule pancreatiche e il ruolo che perturbazioni metaboliche, tipiche del diabete mellito tipo 2, possono svolgere nella modulazione di questa incretina, lo scopo della mia tesi è stato quello di confermare o meno la secrezione di GLP-1 da parte delle alfa cellule murine, il suo ruolo nel modulare l'attività metabolica e la funzionalità delle stesse in presenza o meno di perturbazioni metaboliche come iperglicemia e l'ipernefemia e studiare, per la prima volta, come l'iper glucagonemia e l'interleuchina-6 possono alterare o meno la sintesi e la produzione di questa incretina.

## Capitolo 3. Materiali e metodi

### 3.1 Linea cellulare alfa-TC1 clone 6

Le cellule pancreatiche murine  $\alpha$ -TC1 clone 6 (American Type Culture Collection, ATCC) sono state ottenute per clonazione dalla linea cellulare tumorale  $\alpha$ -TC1, isolata da un glucagonoma indotto in topi transgenici attraverso l'espressione di un gene ibrido, costituito dal promotore di ratto per il pre-proglucagone e dalla sequenza codificante l'oncoproteina-antigene T grande del virus SV40. La linea cellulare parentale da cui derivano è meno differenziata e produce sia il glucagone che l'insulina, mentre la linea che dà origine alle alfa cellule TC1 clone 6 è più differenziata e produce solo glucagone<sup>156,157</sup>.

### 3.2 Coltura cellulare

#### 3.2.1 Subcoltura delle cellule

Appena arrivate in laboratorio, le cellule  $\alpha$ -TC1 clone 6 sono state scongelate in acqua sterile a 37°C, il vial sterilizzato con etanolo e il suo contenuto trasferito sterilmente in una fiasca da 75 cm<sup>2</sup>, contenente 15 ml di Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con FBS al 10% e glucosio 11.1 mmol/l. La fiasca è stata posta per sette giorni in un incubatore a 37°C e CO<sub>2</sub> al 5%, fino al raggiungimento di circa il 75% della confluenza. Al termine del periodo di incubazione e come raccomandato dalla Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards, le cellule sono state tripsinizzate e divise in cinque fiasche, ogni due giorni è stato cambiato il mezzo di coltura e dopo 7 giorni parte delle cellule sono state

---

<sup>156</sup>Chen X, Hermansen K, Xiao J, Bystrup SK, O'Driscoll L, Jeppesen PB. Isosteviol has beneficial effects on palmitate-induced  $\alpha$ -cell dysfunction and gene expression. PLoS One. 2012;7(3):e34361

<sup>157</sup>Shen XX, Li HL, Pan L, Hong J, Xiao J, Hermansen K, Jeppesen PB, Li GW. Glucotoxicity and  $\alpha$  cell dysfunction: involvement of the PI3K/Akt pathway in glucose-induced insulin resistance in rat islets and clonal  $\alpha$ TC1-6 cells. Endocr Res. 2012;37(1):12-24.



risospese in Freezing Medium (DMEM, 11.1 mmol/l glucosio, 20% FBS e 10% dimetilsolfossido-DMSO), stoccate in fiale da 1 ml e congelate in azoto liquido, mentre le altre sono state suddivise in ulteriori fiasche. Il procedimento descritto è stato ripetuto altre due volte affinché le cellule riacquisissero il proprio fenotipo, per essere utilizzate negli esperimenti.

### *3.2.2 Tripsinizzazione cellulare per studi sperimentali*

Una volta raggiunta la confluenza, le cellule sono state lavate con 10 ml di PBS 1X, aspirato il surnatante e ricoperto il fondo della fiasca con 1 ml di tripsina/EDTA allo 0.25% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Dopo un'incubazione di 5 minuti a 37°C, sono stati aggiunti 9 ml di DMEM con FBS al 10% e glucosio 11.1 mmol/l, risospese le cellule, trasferite in un tubo Falcon da 15 ml e centrifugate a temperatura ambiente per 5 minuti a 488 xg. Una volta scartato il surnatante, il pellet è stato risospeso in 10 ml di DMEM con FBS al 10% e glucosio 11.1 mmol/l e trasferito in un tubo Falcon da 15 ml per la conta e la coltura cellulare.

### *3.2.3 Conta cellulare*

Dalla Falcon contenente le cellule in sospensione, sono stati prelevati 10 µl e aggiunti 10 µl di Trypan Blue per valutare il numero di cellule ottenute. La conta cellulare è stata effettuata con il contatore automatizzato Countess® (Life Technologies, Grand Islands, USA). Lo strumento permette una conta delle cellule totali e stima la vitalità cellulare mediante un'analisi avanzata delle immagini. Il software analizza automaticamente l'immagine acquisita dalla fotocamera, riconoscendo come cellule vive quelle nelle quali il Trypan Blue non è entrato e morte quelle colorate in blu (**Figura 8**). In base al numero di cellule vive, sono stati calcolati gli ml da prelevare dalla sospensione iniziale per piastrare un numero di cellule ottimale per ogni punto sperimentale.



**Figura 8.** Contatore automatizzato Countess®. Immagini ottenute da ProductWiki Inc.© 2013 e Countess™-manual Invitrogen™.

### 3.2.4 Disegno sperimentale

Dopo un periodo iniziale di 24h a 37°C in DMEM (FBS 10% e glucosio 11.1 mmol/l) per l'adesione cellulare, il terreno è stato sostituito con DMEM privo di siero contenente glucosio 5.5 mmol/l e le cellule tenute in coltura a 37°C per ulteriori 24h. Questa fase ha la funzione di normalizzare il metabolismo cellulare. Al termine del periodo di incubazione, le cellule sono state coltivate per 16h a 37°C in presenza di glucosio 5.5 mmol/l o glucosio 16.7 mmol/l, con o senza l'aggiunta di una miscela di acidi grassi liberi (oleico e palmitico in rapporto 2:1) 0.5 mmol/l, glucagone 500 pg/ml<sup>158</sup> o interleuchina-6 (IL-6) 200 ng/ml<sup>159</sup>. Per evitare la degradazione del Glucagon-like peptide 1 (GLP-1), nel terreno sono stati aggiunti 10 µmol/l di inibitore della Dipeptidyl Peptidase-4<sup>160</sup> (DPP-4, Ile-Pro-Ile, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

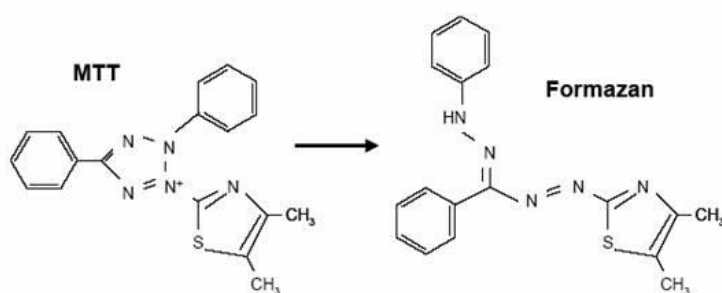
<sup>158</sup>Farhy LS, Chan A, Breton MD, Anderson SM, Kovatchev BP, McCall AL. Association of Basal hyperglucagonemia with impaired glucagon counterregulation in type 1 diabetes. Front Physiol. 2012 Feb 28;3:40. doi: 10.3389/fphys.2012.00040. eCollection 2012.

<sup>159</sup>Huang C, Yang G, Jiang T, Huang K, cao J, Qiu Z. Effect of IL-6 and AG490 on regulation of Stat3 signaling pathway and invasion of human pancreatic cancer cells in vitro. J Exp Clin Cancer Res. 2010. May 19;29:51.

<sup>160</sup>Dorrell C, Grompe MT, Pan FC, Zhong Y, Canaday PS, Shultz LD, Greiner DL, Wright CV, Streeter PR, Grompe M. 2011a. Isolation of mouse pancreatic a, b, duct, and acinar populations with cell surface markers. Mol Cell Endocrinol 339: 144–150.

### 3.3 Valutazione dell'attività metabolica cellulare

L'attività metabolica delle cellule è stata valutata mediante saggio colorimetrico con Methyl-Thiazole-Tetrazolium<sup>161</sup> (MTT Test, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). La metodica valuta il metabolismo cellulare. Infatti, nelle cellule in cui le deidrogenasi mitocondriali erano attive, è stato possibile il taglio dell'anello tetrazolico dell'MTT e la produzione di cristalli di formazano di colore viola all'interno della cellula. I cristalli sono stati quindi dissolti in isopropanolo acidificato e la soluzione viola ottenuta è stata misurata allo spettrofotometro. La quantità di formazano che viene prodotta è direttamente proporzionale al numero di mitocondri attivi e, quindi, al numero di cellule vitali.



**Figura 9.** Formula di struttura dell'MTT e del Formazano. Fonte: famepharma.com.

---

<sup>161</sup>Berridge, M.V., Tan, A.S., 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substratedependence, and involvement of mitochondrial electrontransport in MTT reduction. Arch. Biochem. Biophys. 303, 474–482.

### **Procedura di valutazione del metabolismo cellulare**

- Per  $5 \times 10^4$  cellule aggiungere 10  $\mu$ l di MTT (5 mg/ml in PBS) in 100  $\mu$ l di terreno di coltura;
- lasciare 2h in incubazione<sup>162,163</sup> a 37°C e CO<sub>2</sub> al 5%;
- aspirare il surnatante e aggiungere 100  $\mu$ l di una soluzione di isopropanolo con il 10% di dimetilsolfossido (DMSO), per la solubilizzazione dei cristalli di formazano;
- incubare per 30 minuti al buio;
- leggere a 540 nm (lettura campioni) e 620 nm (background, da sottrarre alla prima lettura).

### **3.4 Valutazione dell'apoptosi e della necrosi cellulare**

L'apoptosi, o morte cellulare programmata, è un fenomeno importante per una corretta omeostasi dei tessuti che permette di eliminare cellule vecchie o danneggiate. In casi di cattiva regolazione questo meccanismo può causare patologie per completa distruzione di un'unità funzionale, di un tessuto o di un organo. Uno dei primi stadi dell'apoptosi è la traslocazione della fosfatidilserina (un fosfolipide di membrana) dal lato interno, al foglietto esterno della membrana plasmatica. I macrofagi, che possiedono recettori per questo fosfolipide, lo riconoscono e rimuovono le cellule in apoptosi fagocitandole. Il kit utilizzato per la misurazione del tasso di apoptosi nelle nostre cellule è stato l'*Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)<sup>164</sup>. L'annexina V (proteina fosfolipidica) è coniugata con il fluoroforo fluoresceina isotiocianato

---

<sup>162</sup>Berridge, M.V., Tan, A.S., 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electrontransport in MTT reduction. Arch. Biochem. Biophys. 303, 474–482.

<sup>163</sup>Liu Y, Schubert D. Cytotoxic amyloid peptides inhibit cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction by enhancing MTT formazan exocytosis. J Neurochem. 1997 Dec;69(6):2285-93.

<sup>164</sup>Chowdhury AA, Chaudhuri J, Biswas N, Manna A, Chatterjee S, Mahato SK, Chaudhuri U, Jaisankar P, Bandyopadhyay S. Synergistic apoptosis of CML cells by buthionine sulfoximine and hydroxychavicol correlates with activation of AIF and GSH-ROS-JNK-ERK-iNOS pathway. PLoS One. 2013 Sep 9;8(9):e73672. doi: 10.1371/journal.pone.0073672. eCollection 2013.

(FITC) e, in presenza di calcio, si lega alla fosfatidilserina emettendo nel verde e rendendo così visibili le cellule in apoptosi. Il kit include lo ioduro di propidio (PI) che si lega al DNA delle cellule necrotiche, dove la membrana cellulare è totalmente compromessa. Questa combinazione permette di differenziare cellule in apoptosi precoce (annessina V positive, PI negative), cellule necrotiche (annessina V positive, PI positive), e cellule vive (annessina V negative, PI negative).

### **Procedura di valutazione delle cellule in apoptosi o necrosi**

- Centrifugare la multiwell da 96 pozzetti, contenenti ciascuno  $5 \times 10^4$  cellule in 100  $\mu$ l di terreno, a 400 xg per 5 minuti a temperatura ambiente;
- aspirare delicatamente il surnatante e aggiungere 100  $\mu$ l di Assay Binding Buffer 1X;
- centrifugare la piastra a 400 xg per 5 minuti a temperatura ambiente;
- aspirare delicatamente il surnatante e aggiungere 50  $\mu$ l di Detection mix (per 500  $\mu$ l di Assay Binding Buffer 1X aggiungere 5  $\mu$ l di Annessina V-FITC 50  $\mu$ g/ml e 10  $\mu$ l PI 100  $\mu$ g/ml), evitando l'esposizione alla luce;
- incubare la piastra al buio per 10 minuti a temperatura ambiente;
- centrifugare a 400 xg per 5 minuti a temperatura ambiente;
- aspirare delicatamente il surnatante e aggiungere 100  $\mu$ l di Assay Binding Buffer 1X;
- procedere alla lettura allo spettrofluorimetro, impostando le seguenti lunghezze d'onda: 485 nm (eccitazione) e 535 nm (emissione) per l'annessina V-FITC, 560 nm (eccitazione) e 595 nm (emissione) per il PI.

### 3.5 Valutazione dello stress ossidativo cellulare

Per la valutazione dello stress ossidativo cellulare è stato utilizzato un kit che prevede l'uso di una forma modificata dell'H<sub>2</sub>DCFDA (2,7-diclorodihidrofluoresceina diacetato): la CM-H<sub>2</sub>DCFDA<sup>165</sup>, una sonda in grado di attraversare passivamente la membrana plasmatica, all'interno della cellula le esterasi operano il taglio dei gruppi acetato e i gruppi clorometile, essendo tiolo-reattivi, reagiscono con il glutathione e con altri tioli intracellulari. La successiva ossidazione del composto formatosi da parte di specie reattive dell'ossigeno produce un addotto fluorescente che rimane intrappolato all'interno della cellula permettendo così studi anche a lungo termine.

#### Procedura valutazione dello stress ossidativo

- Dissolvere la sonda (50 µg di CM-H<sub>2</sub>DCFDA) in 86 µl di DMSO, per ottenere una concentrazione finale 1 mmol/l. Preparare tutto al buio;
- preparare una mix composta da Krebs Ringer Bicarbonate Buffer (5.5 mmol/l glucosio) e dall'1% della sonda;
- aspirare il surnatante da ognuno dei 96 pozzetti della multiwell, contenenti ciascuno 5x10<sup>4</sup> cellule in 100 µl di terreno e aggiungere 100 µl della mix;
- incubare 1h, al buio, in un incubatore a 37°C e CO<sub>2</sub> al 5%;
- aspirare il surnatante, trattare le cellule in base alle condizioni sperimentali ed incubare per 16h a 37°C e CO<sub>2</sub> al 5%;
- procedere alla lettura allo spettrofluorimetro, impostando le seguenti lunghezze d'onda: eccitazione a 495 nm ed emissione a 527 nm.

---

<sup>165</sup>Ilatovskaya DV, Pavlov TS, Levchenko V, Staruschenko A. ROS production as a common mechanism of ENaC regulation by EGF, insulin, and IGF-1. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013 Jan 1;304(1):C102-11. doi: 10.1152/ajpcell.00231.2012. Epub 2012 Nov 7.

### **3.6 Estrazione dell'RNA totale**

Il kit che ha permesso l'estrazione dell'RNA totale è stato il *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN, CA, USA) che aveva in dotazione colonnine con filtro, DNasi, carrier-RNA e buffers di lavaggio. La membrana QIAamp ha permesso l'isolamento dell'RNA intatto e con un elevato grado di purezza, adatto ad un uso in sistemi di amplificazione. Il carrier-RNA ed il buffer AVL hanno favorito il legame dell'RNA alla membrana di silice delle colonnine, mentre la salinità ed il pH hanno fatto sì che i contaminanti e le proteine non si legassero. I tamponi di lavaggio AW1 e AW2 hanno permesso l'eliminazione dei residui, purificando l'RNA e per finire il buffer AVE utilizzato per l'eluizione, essendo RNasi-free e contenendo sodio azide allo 0.04%, ha fatto sì che non vi fosse degradazione del materiale, né contaminazione microbica. Il procedimento di estrazione è stato effettuato utilizzando materiali privi di RNasi, secondo il protocollo riportato di seguito.

#### **Procedura estrazione dell'RNA totale**

- Aspirare il surnatante da ogni piastra Petri da 60 mm x 15 mm contenente  $2 \times 10^6$  cellule, aggiungere 1ml di PBS 1X e procedere allo scraping delle cellule, travasare il tutto in una eppendorf da 1.5 ml e centrifugare a temperatura ambiente per 5 minuti a 200 xg;
- risospendere il pellet cellulare in 140 µl di Hank's Balanced Salt Solution per il mantenimento del pH e dell'equilibrio osmotico;
- aggiungere 560 µl di buffer AVL, 5.6 µl di carrier-RNA e vortexare per 15 secondi;
- incubare 10 minuti a temperatura ambiente;
- vortexare 15 secondi e centrifugare ad 6000 xg per 10 secondi a temperatura ambiente;
- aggiungere 560 µl di etanolo al 100%, vortexare per 15 secondi e centrifugare ad 6000 xg a temperatura ambiente per 10 secondi;

- prelevare 630 µl della soluzione ottenuta, trasferirli in una colonnina con filtro e centrifugare ad 6000 xg per 1 minuto a temperatura ambiente;
- scartare il tubo di raccolta dell'eluato, sostituirlo con uno nuovo e ripetere il passaggio precedente;
- scartare il tubo di raccolta dell'eluato, sostituirlo con uno nuovo, preparare la soluzione composta da 10 µl di DNasi e 90 µl di Buffer per DNasi e introdurre 95 µl nella colonnina con filtro;
- incubare per 15 minuti a temperatura ambiente;
- aggiungere alla colonnina 500 µl di Buffer AW1 e centrifugare a 6000 xg a temperatura ambiente per 1 minuto;
- scartare il tubo di raccolta dell'eluato e sostituirlo con uno nuovo, quindi aggiungere alla colonnina 500 µl di Buffer AW2 e centrifugare a 15700 xg per 3 minuti a temperatura ambiente;
- scartare il tubo di raccolta dell'eluato e sostituirlo con una eppendorf sterile da 1.5 ml, aggiungere alla colonnina 40 µl di Buffer AVE e centrifugare a 6000 xg per 2 minuti a temperatura ambiente;
- scartare la colonnina con filtro e conservare la eppendorf, contenente l'RNA, in ghiaccio.

Procedere subito al prelievo di una piccola aliquota per la quantificazione spettrofotometrica a 260/280 nm che permette di valutare la concentrazione dell'RNA, il quale si conserva per lunghi periodi di tempo a -20°C<sup>166,167,168</sup>.

---

<sup>166</sup>Roussel Y, Wilks M, Harris A, Mein C, Tabaqchali S. Evaluation of DNA extraction methods from mouse stomachs for the quantification of *H. pylori* by real-time PCR. *J Microbiol Methods*. 2005 Jul;62(1):71-81.

<sup>167</sup>Moreno LA, Cox KL. Quantification of dsDNA using the Hitachi F-7000 Fluorescence Spectrophotometer and PicoGreen dye. *J Vis Exp*. 2010 Nov 5;(45). pii: 2465. doi: 10.3791/2465.

<sup>168</sup>Hillar M, Orudiakomo S. Identification of messenger RNA for glutamate dehydrogenase using a spectrophotometric probe. *Mol Biol Rep*. 1986;11(3):131-5.



### 3.7 Retrotrascrizione dell'RNA totale

Il kit utilizzato per la retrotrascrizione dell'RNA totale è stato l'*iScript<sup>TM</sup> cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad, CA, USA). Le soluzioni presenti nel kit sono: la 5x iScript Reaction Mix, l'iScript Reverse Transcriptase e la nuclease-free water. L'enzima trascrittasi inversa, insieme alla soluzione di oligo(dT) e primers esamerici casuali, in presenza di RNA, può sintetizzare molecole di DNA complementari.

#### Procedura retrotrascrizione dell'RNA totale

Aggiungere in una eppendorf da 500 µl:

- 4 µl di 5x iScript Reaction Mix;
- 1 µl di iScript Reverse Transcriptase;
- x µl di RNA per averne 1 µg (la quantità in µl si calcola a seconda della concentrazione di RNA, valutata con metodica spettrofotometrica, come descritto in precedenza);
- x µl di nuclease-free water per raggiungere il volume finale di 20 µl.

Incubare nel termociclatore (GeneAmp PCR System 2400, PerkinElmer, MA, USA):

- 5 minuti a 25 °C
- 30 minuti a 42 °C
- 5 minuti a 85°C
- Portare a 4°C

L'alta temperatura inattiva l'enzima e serve per separare le catene di cDNA di nuova sintesi dall'RNA. Il cDNA ottenuto è stato utilizzato per effettuare la PCR Real-Time o conservato a -20°C<sup>169</sup>.

---

<sup>169</sup>Wojewoda CM, Spahlinger T, Harmon ML, Schnellinger B, Li Q, Dejelo C, Schmotzer C, Zhou L. Comparison of Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 Test version 2.0 (CAP/CTM v2.0) with other Real-time PCR Assays in HIV-1 Monitoring and Follow-up of Low-level Viral Loads. J Virol Methods. 2012 Oct 22.

### 3.8 PCR Real-Time

La PCR (Polymerase Chain Reaction) o reazione a catena della polimerasi, è una metodica di laboratorio nata nel 1983 da un'intuizione di Kary Mullis (Premio Nobel nel 1993) che permette di amplificare un frammento di DNA di estremità note in modo rapido, preciso e sensibile, ma non di quantificarlo. Per ottenere una quantificazione delle molecole di DNA viene utilizzata una variante denominata PCR Real-Time capace di misurare i prodotti di reazione in tempo reale durante tutti i cicli e per questo è la tecnica più utilizzata in microbiologia, diagnostica, biotecnologie e medicina molecolare. L'analisi del plot di amplificazione risultante dalla PCR Real-Time, è fatta definendo un valore soglia (threshold) arbitrario scelto dall'operatore in base ai valori dei bianchi e quando il plot interseca la soglia si definisce il punto Ct (threshold cycle), il ciclo nel quale ciascun campione interseca la threshold line ed è inversamente proporzionale alla quantità di template iniziale. La threshold line è il livello in cui la reazione raggiunge un'intensità di fluorescenza superiore al background, definibile nella fase esponenziale della reazione di amplificazione. Esistono diversi protocolli per l'attuazione di questa tecnica e sono tutti basati sul rilevamento di segnali fluorescenti, i più utilizzati sono: Sybr Green e TaqMan<sup>170,171</sup>. Il primo è un colorante che fluoresce fortemente quando lega il DNA a doppia elica (dsDNA), mentre la fluorescenza dell'altro dipende dalla Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) attraverso l'accoppiamento di un quencher ad una molecola fluorescente chiamata reporter. La Sybr Green è una molecola fluorescente che lega in modo aspecifico il solco minore del DNA a doppio filamento. Il complesso dsDNA-Sybr Green assorbe luce blu alla lunghezza d'onda di 488 nm ed emette luce verde alla lunghezza d'onda di 522 nm. Inizialmente, nella miscela di reazione, sono presenti: DNA, primers e molecole di Sybr Green, durante ogni ciclo di denaturazione, non essendo presente DNA a doppio filamento, le

---

<sup>170</sup>Kierat S, Leś K, Przybylski M, Dzieciatkowski T, Młynarczyk G. [TaqMan fluorescent probe-based real-time PCR assay for detection of varicella-zoster virus]. *Med Dosw Mikrobiol.* 2012;64(2):139-49.

<sup>171</sup>Jensen EC. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction to measure mRNA: use, limitations, and presentation of results. *Anat Rec (Hoboken)*. 2012 Jan;295(1):1-3.

molecole di Sybr Green emetteranno una fluorescenza minima, ma durante l'avanzamento della reazione, nel corso di ogni fase di allungamento, la fluorescenza salirà progressivamente, man mano che aumenterà il numero di copie dell'amplicone. L'incremento di fluorescenza rilevato è quindi proporzionale al numero di molecole Sybr Green intercalate nella doppia elica del DNA<sup>172,173,174</sup>. Purtroppo questa metodica ha il difetto di utilizzare una molecola che lega qualsiasi dsDNA presente nella reazione, compresi i dimeri dei primers e i prodotti aspecifici, comportando una sovrastima della concentrazione del target. Quindi, per avere indicazioni sulla purezza dei prodotti di reazione e sull'eventuale presenza di dimeri di primers, si analizza la curva di melting: quando la reazione di PCR termina, la temperatura da 65°C (fluorescenza massima, tutto il DNA è a doppio filamento) aumenta gradualmente fino a 90°C (fluorescenza minima, il DNA è a singolo filamento) e nel momento in cui la fluorescenza cala rapidamente, provoca un flesso nella curva corrispondente alla temperatura di melting del prodotto di reazione, cioè il 50% del materiale amplificato è in forma di single strand DNA (ssDNA). Nel caso in cui sia visibile più di un flesso, il rischio è quello di aver amplificato target aspecifici. Per comodità i flessi della curva di fluorescenza sono trasformati in picchi facendone la derivata prima.

### **Valutazione dell'espressione genica di PC1/3 e PC2**

- Aggiungere in ogni pozzetto di una piastra multiplate da 48, 10 µl di Sybr Green-iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, UK), 1 µl (0.0001 µmol/µl) di ciascun primer specifico (Primm srl ,MI, Italia) e 7 µl di H<sub>2</sub>O;

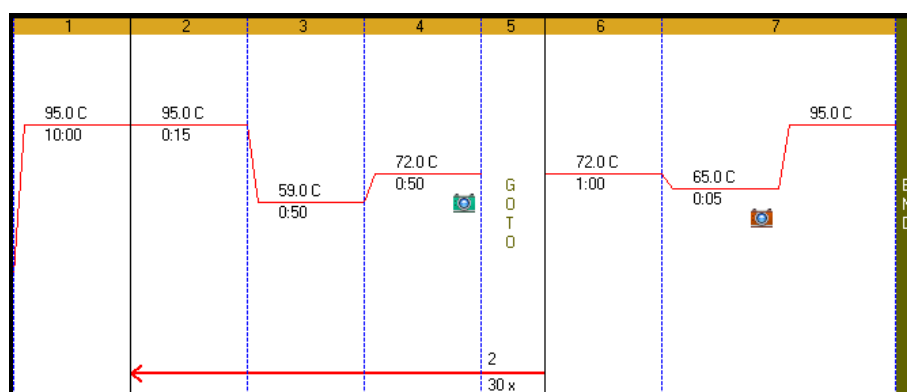
---

<sup>172</sup>Bakshi D, Singhal P, Mahajan SK, Subramaniam P, Tuteja U, Batra HV. Development of a real-time PCR assay for the diagnosis of scrub typhus cases in India and evidence of the prevalence of new genotype of *O. tsutsugamushi*. *Acta Trop*. 2007 Oct;104(1):63-71.

<sup>173</sup>Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res*. 2009 Feb;37(3):e21.

<sup>174</sup>Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002 May 15;30(10):e47).

- aggiungere 1 µl di cDNA (20 ng)<sup>175,176,177</sup> nei pozzetti corrispondenti ai campioni ed 1 µl di H<sub>2</sub>O nei pozzetti corrispondenti ai bianchi, ottenendo un volume finale di 20 µl per ogni pozzetto;
- porre la piastra nel termociclatore e impostare il protocollo.

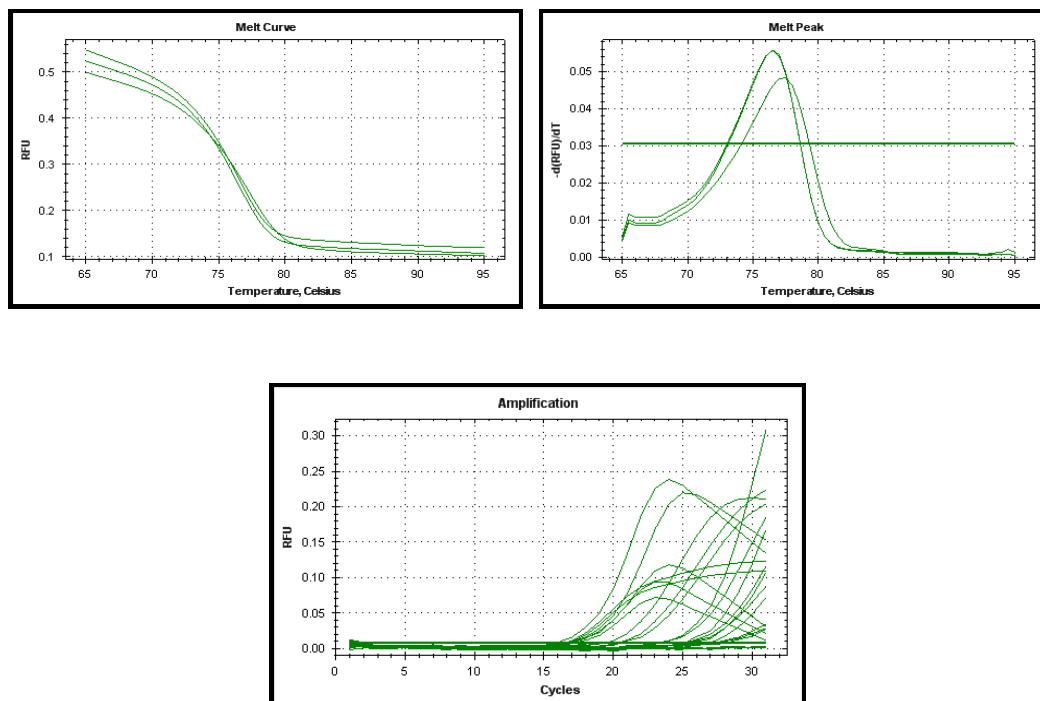


**Figura 10.** Protocollo utilizzato per la valutazione dell'espressione genica di PC1/3.

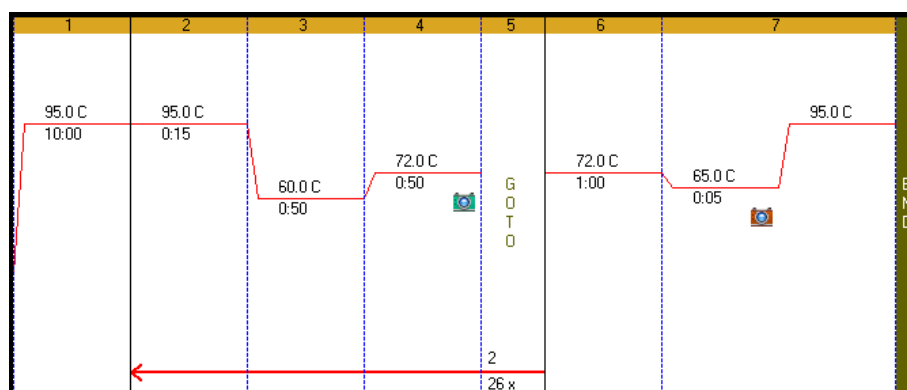
<sup>175</sup>Mauroy A, Poel WH, Honing RH, Thys C, Thiry E. Development and application of a SYBR green RT-PCR for first line screening and quantification of porcine sapovirus infection. BMC Vet Res. 2012 Oct 17;8(1):193.

<sup>176</sup>Chai Z, Ma W, Fu F, Lang Y, Wang W, Tong G, Liu Q, Cai X, Li X. A SYBR Green-based real-time RT-PCR assay for simple and rapid detection and differentiation of highly pathogenic and classical type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus circulating in China. Arch Virol. 2012 Oct 16

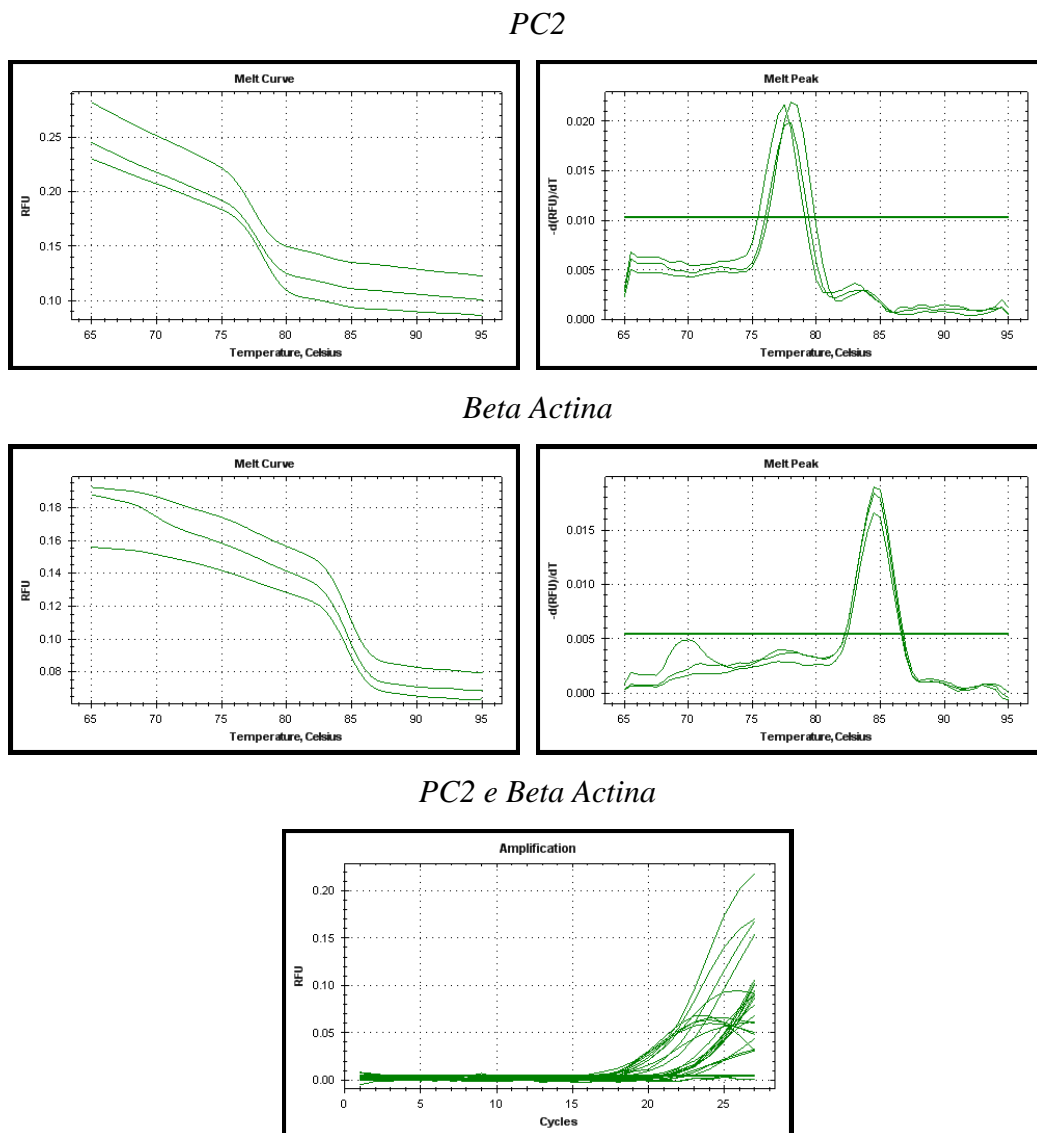
<sup>177</sup>Rajtak U, Leonard N, Bolton D, Fanning S. A Real-Time Multiplex SYBR Green I Polymerase Chain Reaction Assay for Rapid Screening of Salmonella Serotypes Prevalent in the European Union. Foodborne Pathog Dis. 2011 Mar 7.



**Figura 11.** Esempi di curve di melting e amplificazione per PC1/3.



**Figura 12.** Protocollo utilizzato per la valutazione dell'espressione genica di PC2 e Beta Actina.



**Figura 13.** Esempi di curve di melting e amplificazione per PC2 e Beta Actina.

La sequenza dei primers utilizzati è riportata in **Tabella 1**:

Nome	Sequenza
mPC1/3s	ACATGGGGAGAGAATCCTGTAGGCA
mPC1/3r	CATGGCCTTTGAAGGAGTTCCTTGT
mPC2s	TTGATGCAGGTGCCATGGTGAA
mPC2r	ACTTGTCAAAGCCCACCTTGGAG
mBeta-Actin S	AGCTGCCTGACGGCCAGGTC
mBeta-Actin R	TCAGTAACAGTCCGCCTAGAAGC

Per poter confrontare l'espressione di un gene target (nel nostro caso PC1/3 o PC2) in condizioni differenti, è necessario normalizzare i valori ottenuti con quelli di un gene avente espressione costante. Il gene scelto come housekeeping è stato quello codificante per la Beta-Actina: proteina altamente conservata, coinvolta nella struttura, nella motilità e nell'integrità cellulare. La valutazione dei dati è stata eseguita con il metodo  $\Delta\Delta Ct$ <sup>178</sup>, sono state fatte le medie dei cicli soglia (Ct) del gene target e del gene housekeeping sia dei campioni sperimentali che del campione di controllo (5.5 mmol/l glucosio). Successivamente è stata sottratta la media del gene housekeeping da quella ottenuta per il gene target, sia per i campioni sperimentali ( $\Delta Ct$  *campione sperimentale*), che per il campione di controllo ( $\Delta Ct$  *controllo*):

$$\Delta Ct_{c.sperimentale} = \text{media Ct Target}_{c.sperimentale} - \text{media Ct Beta-Actina}_{c.sperimentale}$$

$$\Delta Ct_{c.controllo} = \text{media Ct Target}_{c.controllo} - \text{media Ct Beta-Actina}_{c.controllo}$$

E' stato sottratto il valore di  $\Delta Ct$  del campione di controllo, dal valore di  $\Delta Ct$  di ogni campione sperimentale ed il risultato ( $\Delta\Delta Ct$ ) è stato posto come esponente negativo di 2 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) ottenendo il numero di volte che quel gene target è stato espresso in ogni condizione sperimentale.

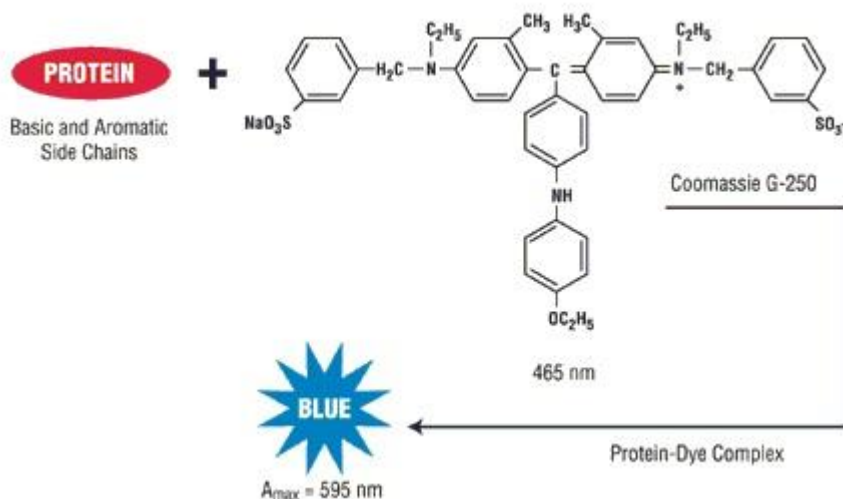
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{c.sperimentale} - \Delta Ct_{c.controllo}$$

---

<sup>178</sup>Kenneth J. Livak, Thomas D. Schmittgen. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. Methods 25, 402–408(2001).

### 3.9 Dosaggio proteico con metodo Bradford

Per dosare le proteine presenti sia nel terreno di coltura che nel lisato cellulare di ogni punto sperimentale, è stato utilizzato il metodo di Bradford. Il reagente Coomassie Brilliant Blue<sup>179</sup> o reagente di Bradford cambia colore se, in soluzione acida, si trova in presenza di amminoacidi o peptidi. A pH inferiore allo zero il colorante è rosso e presenta massima assorbanza a 470 nm, ma in presenza di proteine vira al blu e l'assorbanza massima si sposta a 595 nm. Il reagente lega le proteine formando complessi forti ma non covalenti, basati su una combinazione di forze di Van der Waals e interazioni elettrostatiche. La quantità di colorante che si lega è proporzionale alla quantità di proteine, per cui l'intensità del blu e l'assorbimento saranno proporzionali alla concentrazione proteica del campione in esame.



**Figura 14.** Reazione del reagente di Bradford in presenza di proteine. Fonte: [www.qcbio.com](http://www.qcbio.com).

<sup>179</sup>Aminian M, Nabatchian F, Vaisi-Raygani A, Torabi M. Anal Biochem. 2013 Mar 15;434(2):287-91. doi: 10.1016/j.ab.2012.11.014. Epub 2012 Dec 3. PMID: 23219565



### **Procedura di dosaggio proteico**

- Preparare la curva di taratura diluendo una soluzione standard di albumina da 2 mg/ml a 0.0625 mg/ml: porre 100 µl di soluzione standard in una eppendorf (albumina 2 mg/ml), da questa prelevare 50 µl da porre in un'altra eppendorf e aggiungere 50 µl di Buffer di lisi per il dosaggio del lisato cellulare o DMEM 5.5 mmol/l di glucosio e senza FBS per il dosaggio del surnatante (albumina 1 mg/ml);
- ripetere quest'ultimo passaggio altre 4 volte, a scalare, in altrettante eppendorf ottenendo le seguenti concentrazioni di albumina: 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.0625 mg/ml;
- preparare una eppendorf per il bianco con 100 µl di Buffer di lisi, per dosare le proteine presenti nel lisato cellulare, oppure di DMEM 5.5 mmol/l di glucosio e privo di FBS, per il dosaggio delle proteine nel surnatante;
- caricare una piastra multiwell da 96 pozzetti con 5 µl di ogni soluzione relativa alla curva di taratura, in doppio, partendo dalla meno concentrata (pozzetti A1,A2 - F1,F2);
- nei pozzetti H1,H2 caricare 5 µl di bianco;
- nei pozzetti A3,A4-H3,H4 caricare, in doppio, 5 µl di ogni campione sperimentale da dosare (lisato cellulare o surnatante);
- aggiungere in ogni pozzetto 250 µl di reagente di Bradford e lasciare la piastra in agitazione per 5 minuti;
- procedere alla lettura allo spettrofotometro impostando la lunghezza d'onda di 595 nm;
- costruire la curva di taratura ed estrapolare da essa le concentrazioni dei vari campioni sperimentali in base ai valori di assorbanza ottenuti.

### 3.10 Western Blot

E' stata valutata mediante Western Blot<sup>180</sup> la presenza delle proteine PC1/3 e PC2 nelle alfa cellule pancreatiche piastrate in numero di  $4 \times 10^6$  in capsule di Petri da 60 mm e sottoposte alle diverse condizioni sperimentali. La metodica utilizzata ha permesso di identificare, con anticorpi specifici, la presenza delle proteine di nostro interesse, separate dalle altre per dimensione, mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide. Il campione è stato trattato con  $\beta$ -mercaptoetanolo per ridurre i ponti disolfuro e con sodio dodecil solfato (SDS) per rompere le interazioni idrofobiche delle proteine e caricarle negativamente. L'SDS, legandosi con un rapporto di circa 1.4:1, fa sì che tutte le proteine abbiano un rapporto carica/massa simile e possano migrare unicamente secondo la loro dimensione e non in funzione della loro carica. Terminata la corsa elettroforetica le proteine sono state trasferite su membrana e con anticorpi specifici è stata rilevata la presenza delle proteine di nostro interesse, nel campione sperimentale.

#### Valutazione dell'espressione proteica per PC1/3 e PC2

- Trasferire il surnatante (2 ml circa) dalla piastra di Petri in una eppendorf e centrifugarlo a 200 xg, a 4°C per 5 minuti;
- prelevare il surnatante, utilizzarne 20  $\mu$ l per il dosaggio proteico con il metodo Bradford e conservare il rimanente in una eppendorf a -50°C per i successivi studi di secrezione;
- aggiungere alle cellule adese alla piastra 1 ml di PBS freddo, staccarle dal fondo con uno scraper e travasare in una eppendorf;
- centrifugare a 200 xg, a 4°C per 5 minuti,
- scartare il surnatante e aggiungere 200  $\mu$ l di Buffer di lisi (CellLytic + Inibitore di proteasi) ad ogni pellet, vortexare e lasciare in agitazione, in ghiaccio, per 15 minuti;

---

<sup>180</sup>Dittmer A, Dittmer J. Beta-actin is not a reliable loading control in Western blot analysis. Electrophoresis. 2006 Jul;27(14):2844-5.

- centrifugare a 15700 xg, a 4°C per 15 minuti, così i materiali di scarto precipitano mentre nel surnatante restano le proteine;
- trasferire il surnatante in una eppendorf, prelevare 20 µl per il dosaggio delle proteine con il metodo Bradford e 100 µl da porre in una nuova eppendorf;
- aggiungere 33 µl di Buffer di carica 4X (contenente β-mercaptoetanololo e SDS), vortexare e incubare a 95°C per 5 minuti;
- centrifugare velocemente i campioni e attendere 5 minuti affinché raffreddino;
- posizionare i gel di poliacrilammide (Mini-PROTEAN® Precast Gels, Bio-rad Laboratories, Hemel Hempstead, UK) nella cella per la corsa elettroforetica (Mini-PROTEAN® vertical electrophoresis cells, Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, UK) e aggiungere il Buffer di Corsa 1X;
- caricare ogni pozzetto del gel con 5 µl di marcatore di peso molecolare (*Precision Plus Protein™ Standards Dual Color*, Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, UK) ed una quantità in µl dei diversi campioni, calcolata dalle concentrazioni ottenute con il dosaggio delle proteine con il metodo Bradford, in modo da avere circa 40 µg di proteine in ogni pozzetto;
- procedere con la corsa elettroforetica (SDS-PAGE) a 100 Volt per 1h e 30 minuti;
- recuperare i gel e immergerli in una vaschetta con Buffer di trasferimento;
- immergere nel Buffer di trasferimento le 2 spugne, i 4 fogli di carta e la membrana di nitrocellulosa, necessari per l'allestimento di ogni sandwich;
- attendere 30 minuti;
- assemblare il sandwich (parte nera della camera di supporto/1 spugna/2 fogli di carta/1 gel/1 membrana di nitrocellulosa/2 fogli di carta/1 spugna/parte bianca della camera di supporto) ed inserirlo nella vasca con ghiaccio e Buffer di trasferimento, il tutto posto a sua volta in un contenitore raffreddato;
- impostare lo strumento a 100 Volt per 1h per ottenere il trasferimento delle bande dal gel alla membrana;
- preparare 100 ml di TBS-T: 10 ml di TBS, 90 ml circa di H<sub>2</sub>O Milli-Q e 100 µl di Tween;
- recuperare le membrane di nitrocellulosa, porle in una vaschetta, coprirle interamente con TBS-T e lasciarle 5 minuti in agitazione;

- togliere il TBS-T e aggiungere l'anticorpo contro PC1/3 (anticorpo di topo diluito 1:100 della Santa Cruz, Texas, USA) o quello contro PC2 (anticorpo di coniglio diluito 1:100 della Abcam, Cambridge, UK), parafilmare le vaschette per evitare l'evaporazione della soluzione e lasciarle a 4°C, in agitazione, per 24h.

Il giorno seguente:

- Preparare 400 ml di TBS-T con 40 ml di TBS, 360 ml circa di H<sub>2</sub>O Milli-Q e 400 µl di Tween;
- utilizzare 200 ml di TBS-T e 20 g di latte in polvere per preparare del TBS-milk;
- terminata l'incubazione overnight con il 1°anticorpo, mettere le membrane per 5 minuti in agitazione a temperatura ambiente;
- togliere l'anticorpo primario e cominciare con i lavaggi: aggiungere 7 ml circa di TBS-milk, lasciare 5 minuti in agitazione a temperatura ambiente, togliere il TBS-milk e ripetere per un totale di 2 lavaggi;
- aggiungere l'anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano: per PC1/3 utilizzare anticorpo anti-topo (Santa Cruz, Texas, USA) diluito 1:1000 e per PC2 utilizzare anticorpo anti-coniglio (Santa Cruz Texas, USA) diluito 1:1000;
- lasciare 1h in agitazione a temperatura ambiente;
- togliere l'anticorpo secondario, aggiungere 10 ml di TBS-milk e mettere le membrane in agitazione per 5 minuti;
- togliere il TBS-milk e ripetere il lavaggio altre 2 volte per un totale di 3 lavaggi;
- sciacquare 3 volte con 10 ml di TBS-T e poi altre 3 incubando le membrane in agitazione per 5 minuti;
- appoggiare le membrane su carta assorbente e quando sono asciutte adagiarle ognuna in una vaschetta;
- aggiungere 3 ml di substrato della perossidasi per chemiluminescenza composto da 1.5 ml di detection reagent 1-Luminol Enhancer Solution e 1.5 ml

di detection reagent 2-Peroxide Solution e incubare per 5 minuti a temperatura ambiente;

- poggiare le membrane su carta assorbente e quando sono completamente asciutte inserirle nella cassetta di esposizione (BioMax Cassette, Carestream, NY, USA);
- in camera oscura procedere con lo sviluppo fotografico inserendo la pellicola fotografica nella cassetta di esposizione così che venga impressionata dalla luce emessa dalla membrana;
- immergere la pellicola fotografica per 1 minuto in una vasca con soluzione rivelatrice, per 2 minuti in una vasca con soluzione fissativa, per 3 minuti in una vasca con H<sub>2</sub>O e quindi lasciare asciugare le pellicole sviluppate per 10 minuti circa;
- riportare sulla pellicola le bande del marker e i kDa corrispondenti, come riferimento (bande PC1/3 e PC2:70/80 kDa);
- recuperare le membrane, porle ognuna in una vaschetta e lavarle con TBS-T per 3 volte, lasciandole in agitazione per 5 minuti ad ogni lavaggio;
- togliere il TBS-T, aggiungere l'anticorpo primario di capra contro l'actina (Santa Cruz, Texas, USA, diluito 1:500), parafilmare le vaschette per evitare l'evaporazione della soluzione e metterle a 4°C, in agitazione, per 24h;
- utilizzare il protocollo descritto sopra per ottenere i valori relativi all'Actina utilizzando l'anticorpo secondario anti-capra (Santa Cruz, Texas, USA, diluito 1:5000);
- concludere scannerizzando le pellicole ottenute ed utilizzando il programma Image-J misurare la densità delle bande per normalizzarla con il valore ottenuto per l'Actina.

### **3.11 Valutazione della secrezione di GLP-1 totale con metodo ELISA**

Il saggio è stato svolto utilizzando una micropiastra con pozzetti rivestiti da una quantità pretitolata di anticorpo policlonale anti-GLP-1. Un'aliquota del campione sperimentale è stata posta in ogni pozzetto, il GLP-1 presente nel campione è stato catturato dall'anticorpo fissato sul fondo. E' stato fornito un anticorpo secondario, monoclonale, anti-GLP-1, biotinilato, coniugato con perossidasi di rafano il quale si è legato al GLP-1 immobilizzato ed in presenza del substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) ha prodotto una reazione colorimetrica. La reazione è stata rilevata tramite misurazione spettrofotometrica a 450 nm correggendo con una seconda misurazione a 590 nm: l'aumento di assorbimento è stato direttamente proporzionale alla quantità di GLP-1 catturato. Il GLP-1 presente nel campione sperimentale è stato ricavato interpolando l'assorbanza con la curva di riferimento generata, nello stesso saggio, con standard di GLP-1 a concentrazioni note.

#### **Valutazione della secrezione di GLP-1 totale**

- Riempire ogni pozzetto con 300 µl di tampone di lavaggio 1x (Tris-Buffered Saline e Tween-20), decantare e rimuovere ciò che resta invertendo la piastra e asciugando velocemente;
- ripetere la procedura;
- aggiungere in duplicato 50 µl di matrix solution (soluzione contenente siero che mima il background del surnatante) nei pozzetti destinati ai controlli di qualità, ai bianchi e agli standard;
- aggiungere in duplicato 50 µl di tampone ai pozzetti dei campioni e dei bianchi;
- aggiungere in duplicato 50 µl di ogni GLP-1 standard, in ordine di concentrazione crescente, nei rispettivi pozzetti e 50 µl di campione sperimentale (surnatante) nei pozzetti stabiliti;

- incubare a temperatura ambiente per 1h e 30 minuti su un agitatore circolare per micropiastre a velocità moderata;
- decantare e rimuovere la soluzione rimanente invertendo la piastra, quindi asciugare velocemente;
- lavare i pozzetti per 3 volte con 300 µl di tampone di lavaggio, decantando e asciugando dopo ogni passaggio per eliminare i materiali non legati;
- aggiungere in ogni pozzetto 100 µl di Detection Antibody Solution (soluzione pretitolata di anticorpo anti-GLP-1 monoclonale biotinilato) e incubare 1h a temperatura ambiente su agitatore circolare;
- decantare e asciugare la piastra, lavare i pozzetti per 3 volte con 300 µl di tampone di lavaggio, decantando e asciugando dopo ogni passaggio per allontanare il materiale non legato;
- aggiungere ad ogni pozzetto 100 µl di soluzione contenente l'enzima (streptavidina-perossidasi di rafano pretitolata in tampone) e incubare a temperatura ambiente in agitatore a velocità moderata, per 30 minuti;
- decantare e asciugare la piastra, lavare i pozzetti per 3 volte con 300 µl di tampone di lavaggio, decantando e asciugando la piastra dopo ogni passaggio affinché venga eliminato l'eccesso di enzima non legato;
- aggiungere in ogni pozzetto 100 µl di soluzione contenente il substrato della perossidasi (TMB) e agitare per 20 minuti circa: apparirà una colorazione blu, ben visibile nei pozzetti contenenti gli standard, di intensità proporzionale alla concentrazione di GLP-1;
- aggiungere 100 µl di soluzione di arresto (HCl 0.3M) ed agitare la piastra a mano: il colore virerà da blu a giallo (acidificazione);
- leggere l'assorbanza a 450 nm e 590 nm e correggere per differenza ( $A_{450\text{ nm}} - A_{590\text{ nm}}$ ).

### **3.12 Valutazione della secrezione di GLP-1 attivo con metodo ELISA**

Per poter quantificare la secrezione di GLP-1 attivo da parte delle alfa cellule, sono state usate micropiastre con anticorpo monoclonale, immobilizzato

nei pozzetti. L'anticorpo è in grado di catturare in modo specifico la porzione N-terminale del GLP-1 attivo, fornendo poi un anticorpo policlonale secondario anti-GLP-1, coniugato con fosfatasi alcalina, assieme al substrato metil umbelliferil fosfato (MUP), è stato possibile assistere alla formazione del prodotto fluorescente umbelliferone. La fluorescenza generata è stata direttamente proporzionale alla quantità di GLP-1 attivo presente nel campione sperimentale e la concentrazione è stata ricavata grazie alla curva standard generata nello stesso saggio, con standard aventi concentrazioni note di GLP-1 attivo.

### **Valutazione della secrezione di GLP-1 attivo**

- Aggiungere 300 µl a pozzetto di tampone di lavaggio (PBS, Tween-20 e Sodio Azide), incubare per 5 minuti a temperatura ambiente, decantare e asciugare la piastra;
- aggiungere 200 µl di Assay Buffer (PBS, inibitori di proteasi, Tween-20, 0.08 % sodio azide e 1 % BSA) nei pozzetti relativi al bianco e 100 µl in tutti i pozzetti rimanenti;
- aggiungere, in ordine di concentrazione crescente, 100 µl di standard nei relativi pozzetti;
- aggiungere 100 µl dei campioni da determinare nei pozzetti rimanenti e agitare delicatamente la piastra;
- sigillare la piastra con la pellicola fornita e incubare per 24h a 4°C.

Il giorno seguente:

- Decantare il liquido dalla piastra e asciugare l'eccesso;
- lavare 5 volte la piastra con 300 µl per pozzetto di tampone di lavaggio e durante il 4° lavaggio incubare 5 minuti a temperatura ambiente;
- dopo il 5° lavaggio asciugare la piastra per rimuovere i materiali non legati;
- aggiungere immediatamente 200 µl di anticorpo anti-GLP-1 coniugato con fosfatasi alcalina e lasciare in incubazione per 2h a temperatura ambiente;



- lavare 3 volte ogni pozzetto con 300 µl di tampone di lavaggio e asciugare l'eccesso per togliere l'anticorpo non legato;
- aggiungere 200 µl di substrato MUP evitando l'esposizione alla luce;
- incubare per almeno 20 minuti a temperatura ambiente, al buio, monitorando la piastra al fluorimetro per vedere quando il punto più basso ed il punto più alto della curva standard sono abbastanza lontani, cioè quando si ottiene un rapporto significativo tra i due;
- aggiungere 50 µl in ogni pozzetto di soluzione di stop seguendo l'ordine in cui è stato aggiunto il substrato;
- incubare per 5 minuti a temperatura ambiente, al buio, per arrestare l'attività della fosfatasi;
- leggere la piastra con un lettore di fluorescenza impostando la lunghezza d'onda di eccitazione sui 355 nm e quella di emissione sui 460 nm.

### **3.13 Valutazione della secrezione di glucagone con metodo ELISA**

Il saggio per la valutazione della secrezione di glucagone<sup>181</sup> è stato svolto con metodica ELISA utilizzando micropiastre con pozzetti rivestiti da anticorpo monoclonale, specifico per il riconoscimento ed il legame con il glucagone. Se il glucagone è presente nel campione sperimentale (surnatante), si lega all'anticorpo primario e tramite un anticorpo secondario, coniugato con perossidasi, è possibile evidenziare il sandwich fornendo il substrato all'enzima. Utilizzando degli standard contenenti concentrazioni note di glucagone, è stato possibile allestire la curva standard, all'interno del medesimo saggio.

---

<sup>181</sup>Heller RS, Aponte GW: Intra-islet regulation of hormone secretion by glucagon-lik peptide-1 (7-36)amide. Am J Physiol 269:G853–G860, 1995

### **Valutazione della secrezione di glucagone**

- Lavare ed aspirare ogni pozzetto con 300 µl di soluzione di lavaggio (tensioattivo in tampone), per almeno 2 volte, dopo l'ultimo lavaggio rimuovere ogni residuo per aspirazione, poi invertire la piastra ed asciugarla;
- aggiungere 150 µl di Diluente RD1-110 in ogni pozzetto (soluzione proteica);
- aggiungere 50 µl di Standard nei pozzetti dedicati, in ordine di concentrazione crescente, e 50 µl di campione nei rispettivi pozzetti;
- coprire con l'adesivo in dotazione e incubare per 3h a temperatura ambiente;
- aspirare ogni pozzetto e procedere al lavaggio con 300 µl di tampone di lavaggio;
- ripetere il passaggio per un totale di 4 lavaggi per eliminare i materiali in eccesso;
- aggiungere 200 µl a pozzetto di anticorpo monoclonale diretto contro il glucagone immobilizzato, coniugato con perossidasi di rafano,
- incubare per 1h a 2-8°C;
- lavare ogni pozzetto 3 volte per eliminare l'anticorpo in eccesso, aggiungere 200 µl di substrato (perossido di idrogeno e tetrametilbenzidina in rapporto 1:1) e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente;
- aggiungere 50 µl a pozzetto di soluzione bloccante (acido solforico): viraggio da blu a giallo;
- leggere la piastra entro 30 minuti, alla lunghezza d'onda di 450 nm.

### **3.14 Analisi statistica**

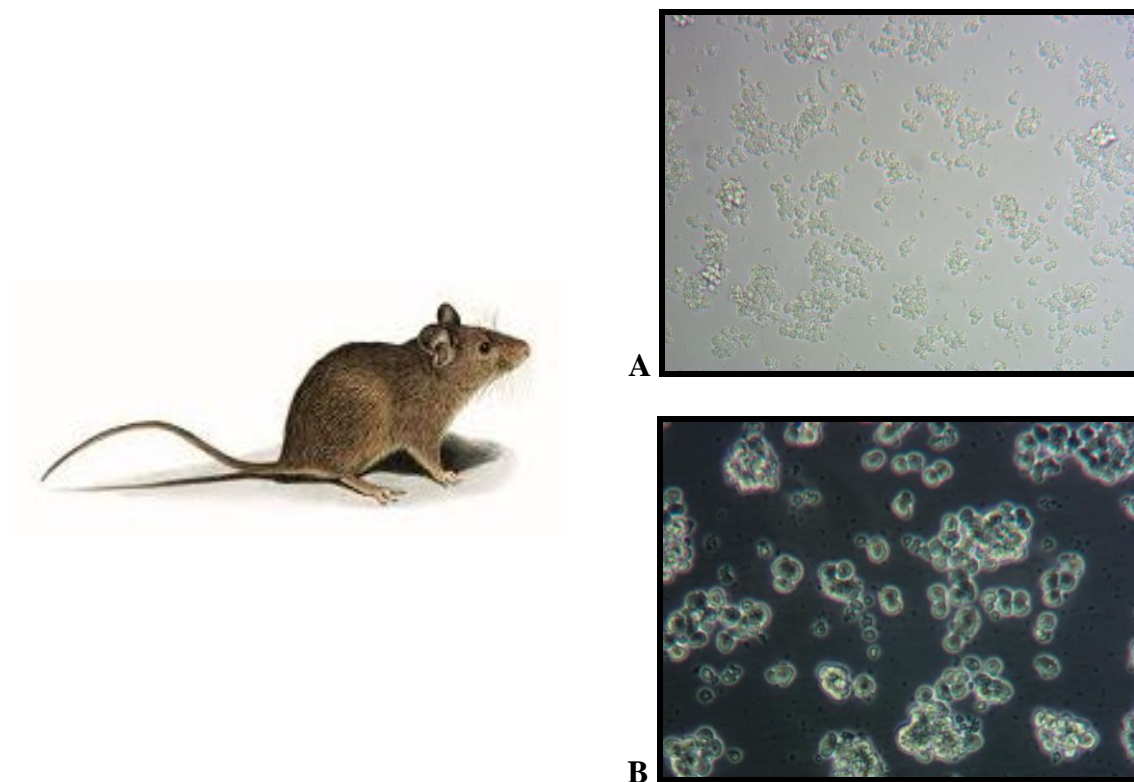
Per la valutazione statistica dei dati raccolti è stato utilizzato il Test-t di Student per campioni indipendenti (controllo/trattamento). Per ogni campione è stata misurata una variabile numerica, è stata calcolata la media e valutato se la differenza della media relativa al campione di controllo rispetto a quella relativa al campione trattamento, era significativa, cioè se era presente una reale diversità tra i due campioni sperimentali non imputabile al caso. Il livello di significatività impostato è quello del 5%, quindi per  $p < 0.05$  la probabilità che la differenza riscontrata tra i due campioni in esame è casuale è inferiore al 5%, quindi il test è

considerato statisticamente significativo e le due medie sono valutate come significativamente diverse. I valori sono stati espressi come variazione percentuale rispetto al controllo.

## Capitolo 4. Risultati

### 4.1 Caratteristiche della linea cellulare studiata

La linea cellulare studiata è costituita da cellule pancreatiche murine clonate da alfa cellule TC1 ( $\alpha$ -TC1 clone 6), derivanti da adenoma indotto in topo transgenico che esprime l'antigene oncogene T largo SV40, sotto il controllo del promotore del pre-proglucagone di ratto. La linea cellulare parentale da cui derivano è meno differenziata e produce sia il glucagone che l'insulina, mentre la linea che dà origine alle alfa cellule TC1 clone 6 è più differenziata e produce solo glucagone<sup>149,150</sup>.

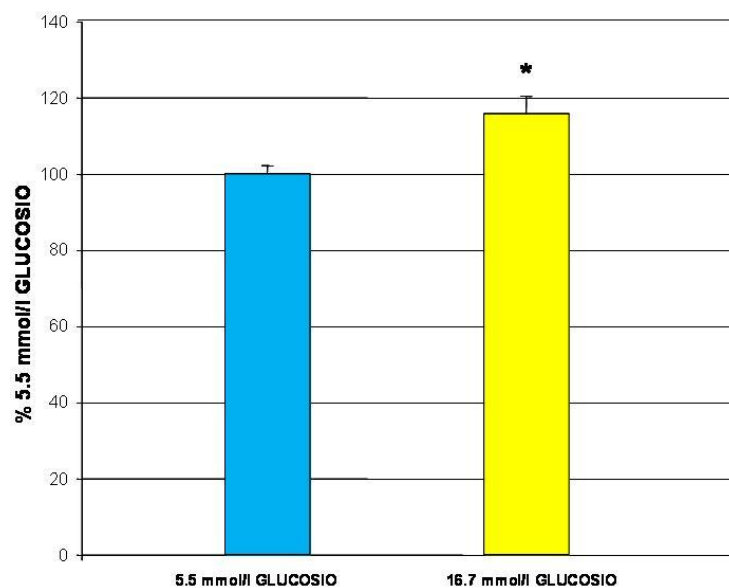


**Figura 15A-B.** Cellule pancreatiche murine clonate da TC1 ( $\alpha$ -TC1clone 6) fotografate con ingrandimento 10X (A) e 40X (B).

## 4.2 Risultati 1. Studio del GLP-1 in alfa-cellule pancreatiche murine (alfa-TC1 clone 6) esposte ad alto glucosio.

### 4.2.1 Attività metabolica cellulare

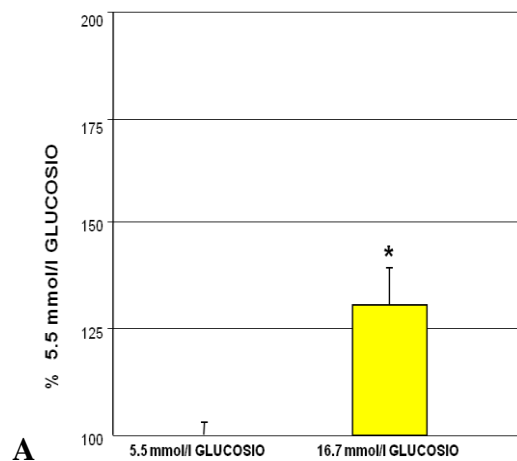
Al termine del periodo di incubazione, sulle cellule esposte a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, è stata valutata l'attività metabolica cellulare attraverso il test con MTT. Come riportato in **Figura 16**, le alfa cellule esposte per 16h ad elevata concentrazione di glucosio avevano un'attività metabolica significativamente maggiore ( $116 \pm 5\%$ ) rispetto alle cellule esposte a glucosio 5.5 mmol/l ( $100 \pm 2\%$ ) ( $p < 0.05$ , Test-t di Student). A differenza delle beta-cellule, le alfa-cellule sembrano essere più resistenti alle perturbazioni metaboliche, in particolare agli effetti tossici legati a una prolungata esposizione ad elevate concentrazioni di glucosio (**Figura 16**).

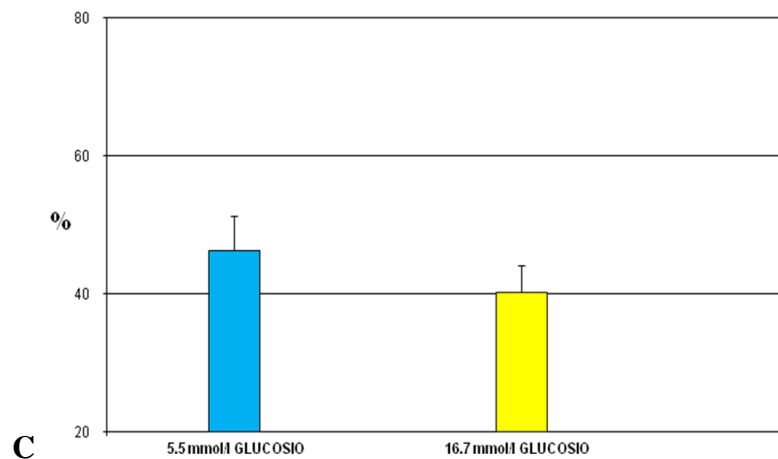
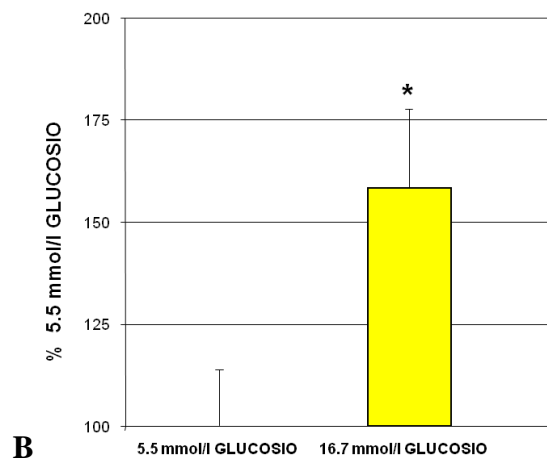


**Figura 16.** Test di attività metabolica cellulare con MTT su alfa cellule esposte per 16h a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l (\*= $p < 0.05$  vs 5.5 mmol/l glucosio. Test-t di Student).

#### 4.2.2 Valutazione del GLP-1 totale, attivo e rapporto attivo/totale in cellule alfa-TC1 clone 6 esposte a glucosio 16.7 mmol/l

Al termine del periodo di incubazione, nel surnatante delle alfa cellule esposte sia a glucosio 5.5 che 16.7 mmol/l, è stata misurata la secrezione di GLP-1 totale e attivo. Come evidenziato in **Figura 17A**, la concentrazione di GLP-1 totale aumentava significativamente nelle cellule esposte ad alto glucosio ( $130\pm 9\%$ ), rispetto a quelle incubate con glucosio 5.5 mmol/l ( $100\pm 3\%$ ) ( $p < 0.05$ , Test-t di Student). Parallelamente, anche la forma attiva veniva rilasciata nel mezzo in quantità significativamente maggiore dalle alfa cellule esposte a glucosio 16.7 mmol/l ( $158\pm 19\%$ ), rispetto al controllo ( $100\pm 14\%$ ) ( $p < 0.05$ , Test-t di Student) (**Figura 17B**). Il rapporto fra le due forme di GLP-1 indicava che, durante tutto il periodo di incubazione, la quantità di forma attiva veniva rilasciata in maniera proporzionale a quella totale, in una percentuale di circa il 40% (**Figura 17C**).



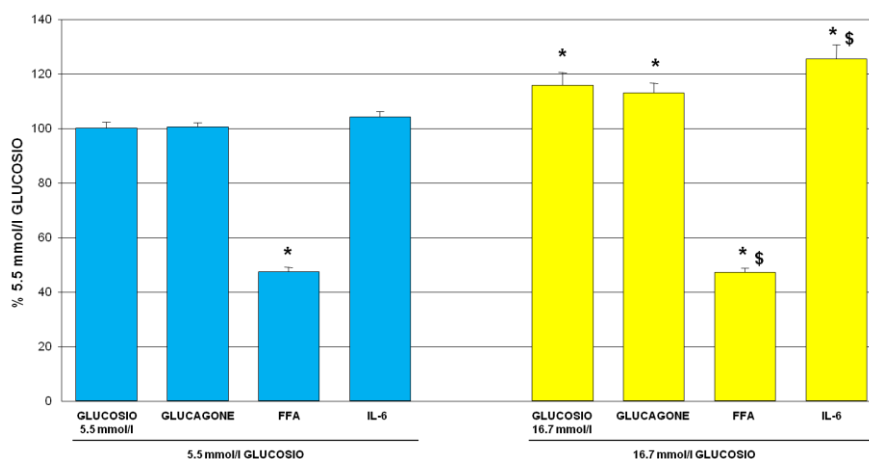


**Figura 17A-C.** Secrezione di GLP-1 totale (A), attivo (B) e rapporto fra le due forme (C). Rispetto al controllo con glucosio 5.5 mmol/l, la secrezione sia della forma totale che di quella attiva aumentavano significativamente dopo coltura delle cellule in una soluzione contenente glucosio 16.7 mmol/l (\*= $p < 0.05$  vs 5.5 mmol/l glucosio, Test-t di Student). Il rapporto fra le due forme indicava un rilascio proporzionale durante tutto il periodo di incubazione a glucosio 16.7 mmol/l.

### 4.3 Risultati 2. Studio del GLP-1 in alfa-cellule pancreatiche murine (alfa-TC1 clone 6) esposte a Glucagone, FFA e IL-6

#### 4.3.1 Attività metabolica cellulare

Come riportato in **Figura 18**, solo la presenza di una miscela di acidi grassi a catena lunga 0.5 mmol/l nel terreno di coltura di alfa cellule murine coltivate in presenza di glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, ha determinato una riduzione significativa dell'attività metabolica cellulare (glucosio 5.5+FFA  $47\pm 2$ ; glucosio 16.7+FFA  $47\pm 2$ , %), rispetto al controllo (glucosio 5.5:  $100\pm 2$ , %) (tutto  $p < 0.05$  vs glucosio 5.5 mmol/l. Test-t di Student). Inoltre la combinazione alto glucosio ed FFA ha provocato un decremento significativo rispetto al solo glucosio 16.7 mmol/l ( $116\pm 5\%$ ). Dai nostri dati sperimentali, l'IL-6 determina un aumento significativo dell'attività metabolica in cellule esposte ad alto glucosio ( $125\pm 5\%$ ), rispetto al controllo e al glucosio 16.7 mmol/l ( $p < 0.05$ ). Contrariamente, la presenza nel terreno di coltura di glucagone 500 pg/ml, a basso glucosio non determinava nessun cambiamento rispetto al controllo, mentre ad alto glucosio l'incremento era significativo ( $113\pm 4\%$ ) (**Figura 18**).

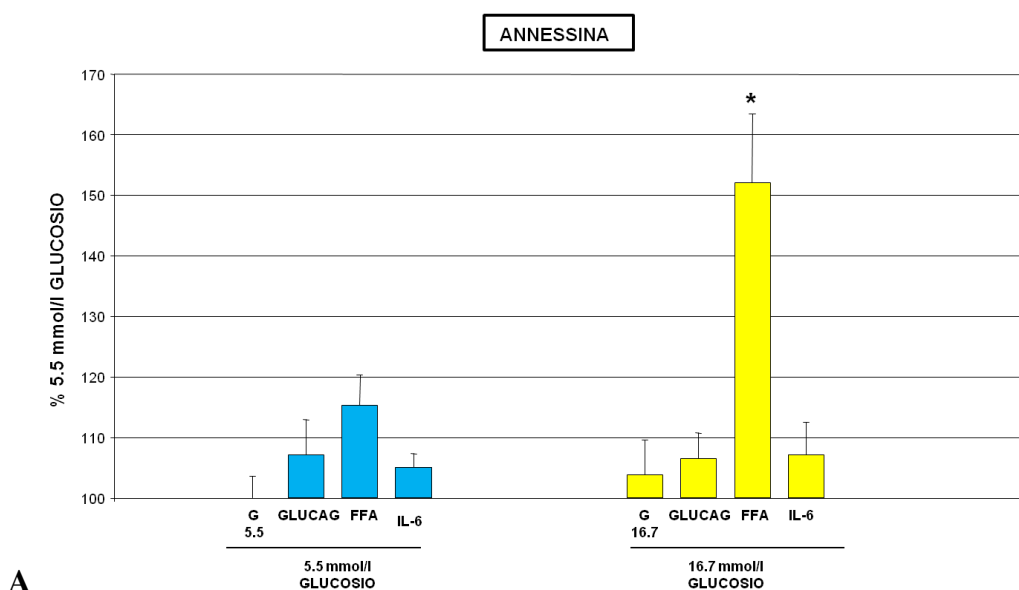


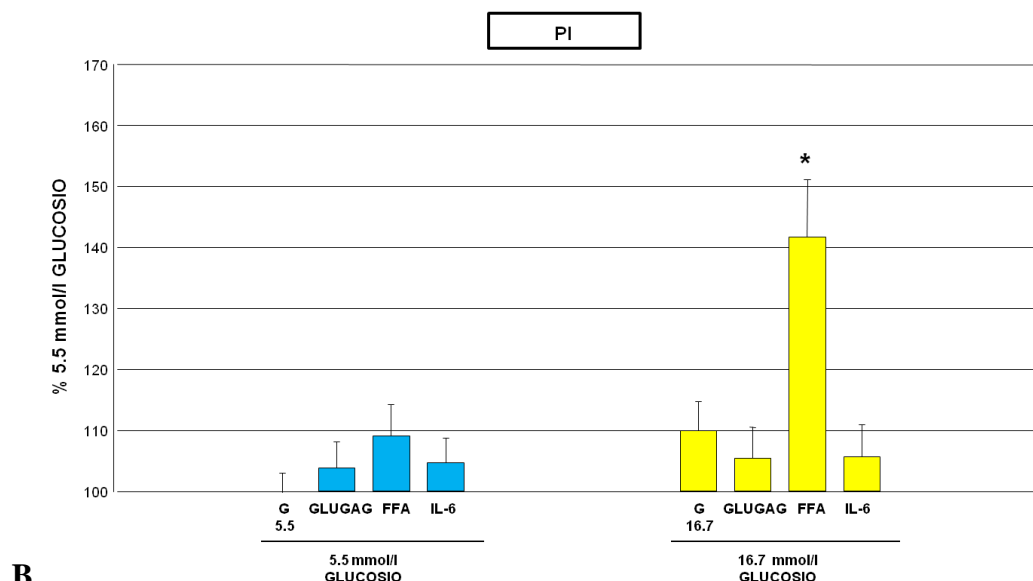
**Figura 18.** Test di attività metabolica cellulare con MTT su alfa cellule esposte per 16h a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, con o senza l'aggiunta nel terreno di coltura di una miscela di acidi grassi liberi (FFA, oleico:palmitico, 2:1) 0.5 mmol/l, glucagone 500 pg/ml o IL-6 200 ng/ml. L'attività metabolica, in presenza di FFA è significativamente ridotta rispetto ai controlli (\*= $p < 0.05$  vs glucosio 5.5 mmol/l. \$= $p < 0.05$  vs glucosio 16.7 mmol/l. Test-t di Student).



#### 4.3.2 Valutazione del tasso di apoptosi e necrosi cellulare

Come riportato in **Figura 19A-B**, 16 ore di coltura delle alfa cellule in presenza di un'elevata concentrazione di glucosio e acidi grassi sembra modulare sia il processo di apoptosi che quello di necrosi. In particolare, gli FFA inducono un aumento significativo sia del tasso di apoptosi ( $152 \pm 11\%$ ) (**Figura 19A**) che quello di necrosi ( $142 \pm 9\%$ ) (**Figura 19B**) in presenza di glucosio 16.7 mmol/l, rispetto a glucosio 5.5 mmol/l da solo ( $*=p<0.05$  vs glucosio 5.5 mmol/l. Test-t di Student). Alle nostre condizioni sperimentali, sia il glucagone che l'IL-6 non sembrano attivare il processo di apoptosi o necrosi nelle alfa cellule pancreatiche.



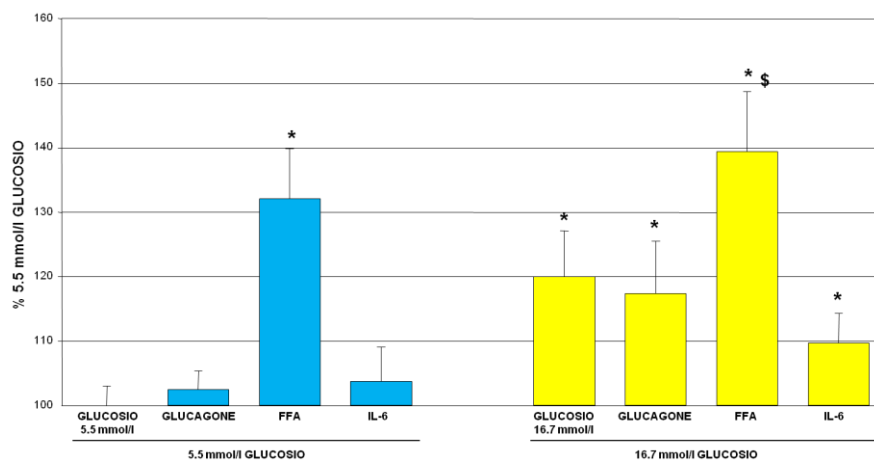


**Figura 19A-B.** Valutazione del tasso di apoptosi (A) e di necrosi (B) in alfa cellule esposte per 16h a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, con o senza l'aggiunta nel terreno di coltura di una miscela di acidi grassi liberi (FFA, oleico:palmitico, 2:1) 0.5 mmol/l, glucagone 500 pg/ml o IL-6 200 ng/ml. Sia il tasso di apoptosi che quello di necrosi aumentano in presenza di FFA, mentre non cambiano in presenza di glucagone e IL-6 (\*= $p < 0.05$  vs glucosio 5.5 mmol/l. Test-t di Student).

#### 4.3.3 Valutazione dello stress ossidativo

Lo stress ossidativo è stato misurato valutando la presenza di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) nel terreno di coltura delle alfa cellule esposte per 16h a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, con o senza l'aggiunta di FFA, glucagone o IL-6. Come riportato in **Figura 20**, 16 ore di coltura delle alfa cellule in presenza di un'elevata concentrazione di glucosio inducono un aumento significativo della concentrazione di ROS ( $120 \pm 7\%$ ), rispetto alle cellule esposte a glucosio 5.5 mmol/l ( $100 \pm 3\%$ ) (\*= $p < 0.05$ ). La presenza di FFA determina un aumento dello stress ossidativo sia a basso ( $132 \pm 8\%$ ) che alto ( $139 \pm 9\%$ ) glucosio, rispetto al controllo (\*= $p < 0.05$  vs glucosio 5.5 mmol/l; \$= $p < 0.05$  vs glucosio 16.7 mmol/l. Test-t di Student). Parallelamente al dato di attività metabolica, apoptosi e necrosi, anche per quanto riguarda lo stress ossidativo, alle nostre condizioni sperimentali,

sia il glucagone che l'IL-6 non sembrano modulare lo stress ossidativo nelle alfa cellule pancreatiche murine.



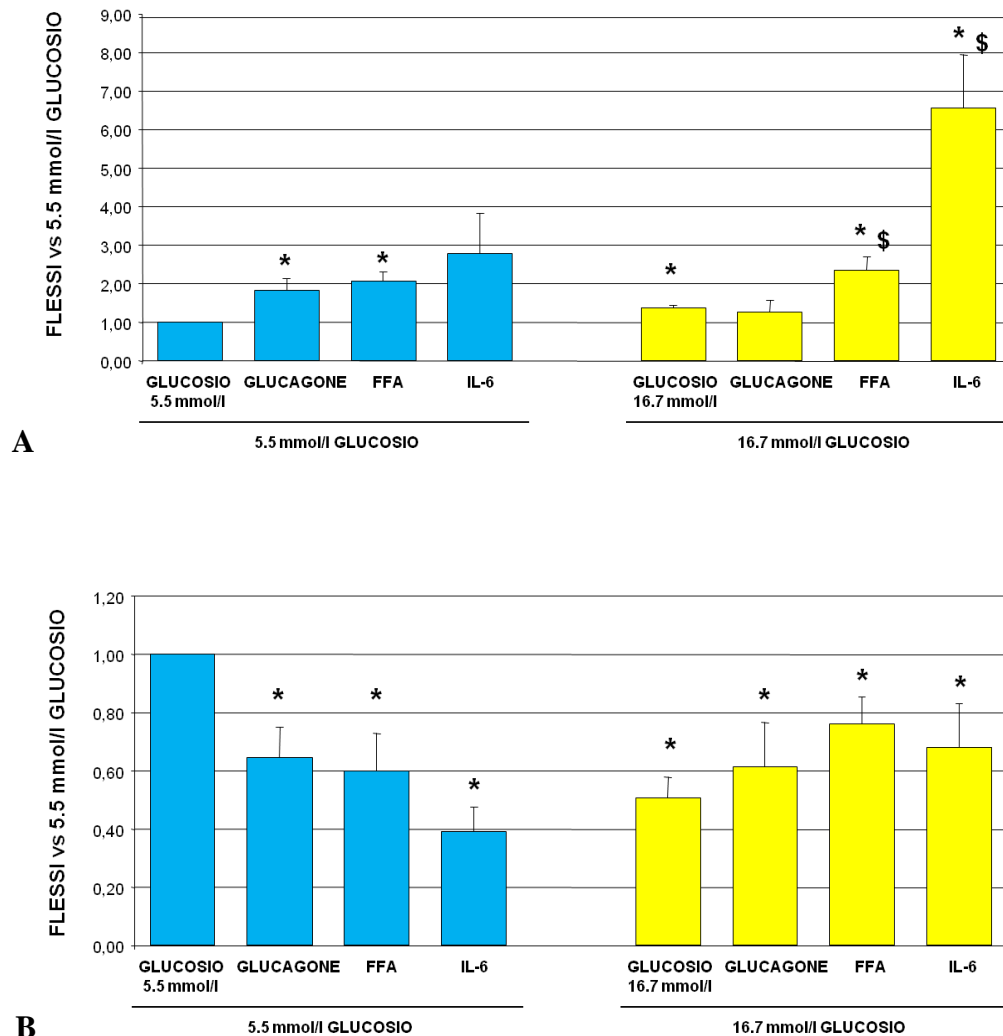
**Figura 20.** Valutazione della concentrazione di ROS in alfa cellule esposte per 16h a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, con o senza l'aggiunta nel terreno di coltura di una miscela di acidi grassi liberi (FFA, oleico:palmitico, 2:1) 0.5 mmol/l, glucagone 500 pg/ml o IL-6 200 ng/ml. Lo stress ossidativo aumenta significativamente nelle cellule incubate con alto glucosio da solo e con FFA sia in presenza di glucosio 5.5 che 16.7 mmol/l (\*= $p < 0.05$  vs glucosio 5.5 mmol/l; \$= $p < 0.05$  vs glucosio 16.7 mmol/l. Test-t di Student).

#### 4.3.4 Studi di espressione genica

##### Espressione genica per PC1/3 e PC2

Come riportato in **Figura 21A-B**, l'incubazione delle alfa cellule per 16h in presenza di una miscela di acidi grassi, glucagone o IL-6, ha determinato un'alterazione dell'espressione sia di PC1/3 che di PC2. In particolare, come riportato in **Figura 21A**, il messaggero per PC1/3 aumenta significativamente in tutte le condizioni sperimentali ad eccezione che per l'IL-6 a basso glucosio, rispetto alle cellule esposte a glucosio 5.5 mmol/l (tutto  $p < 0.05$ ). Inoltre, la presenza sia di FFA che di IL-6 induce una variazione significativa dell'espressione rispetto anche a glucosio 16.7 mmol/l (\$=  $p < 0.05$ ) (**Figura 21A**). Parallelamente, abbiamo osservato una riduzione significativa dell'espressione genica di PC2 sia in presenza di FFA che di glucagone e IL-6, rispetto a glucosio

5.5 mmol/l. Questa ridotta espressione viene mantenuta anche in presenza di alto glucosio (\*= $p<0.05$  vs glucosio 5.5 mmol/l. Test-t di Student) (**Figura 21B**).

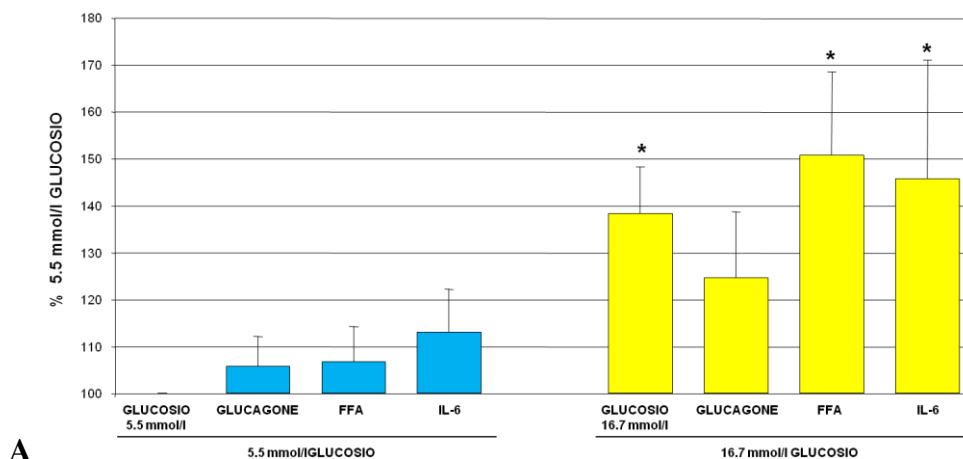


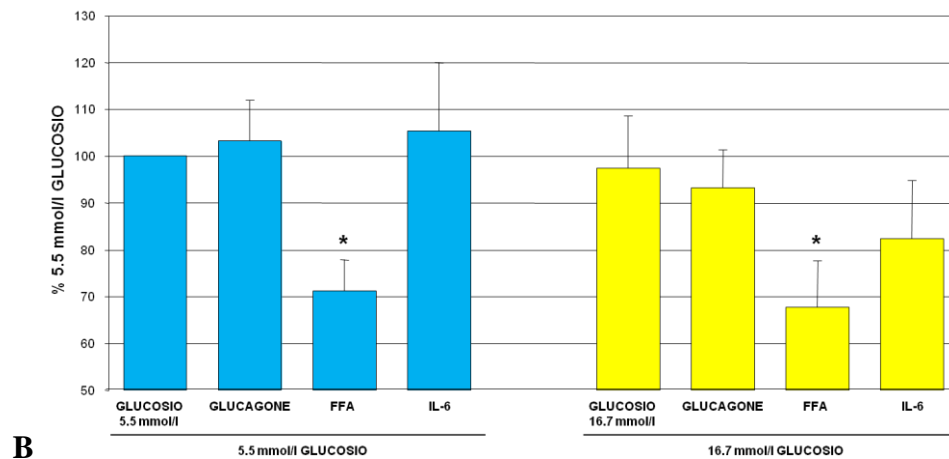
**Figura 21A-B.** Espressione genica per PC1/3 (panello **A**) e PC2 (panello **B**) in alfa cellule esposte per 16h a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, con o senza l'aggiunta nel terreno di coltura di una miscela di acidi grassi liberi (FFA, oleico:palmitico, 2:1) 0.5 mmol/l, glucagone 500 pg/ml o IL-6 200 ng/ml. Sia gli FFA che il glucagone e l'IL-6 sembrano essere in grado di modulare l'espressione nelle alfa cellule di entrambi gli enzimi (\*= $p<0.05$  vs glucosio 5.5 mmol/l. \$= $p<0.05$  vs glucosio 16.7 mmol/l. Test-t di Student).

#### 4.3.5 Studi di espressione proteica

##### Espressione proteica per PC1/3 e PC2

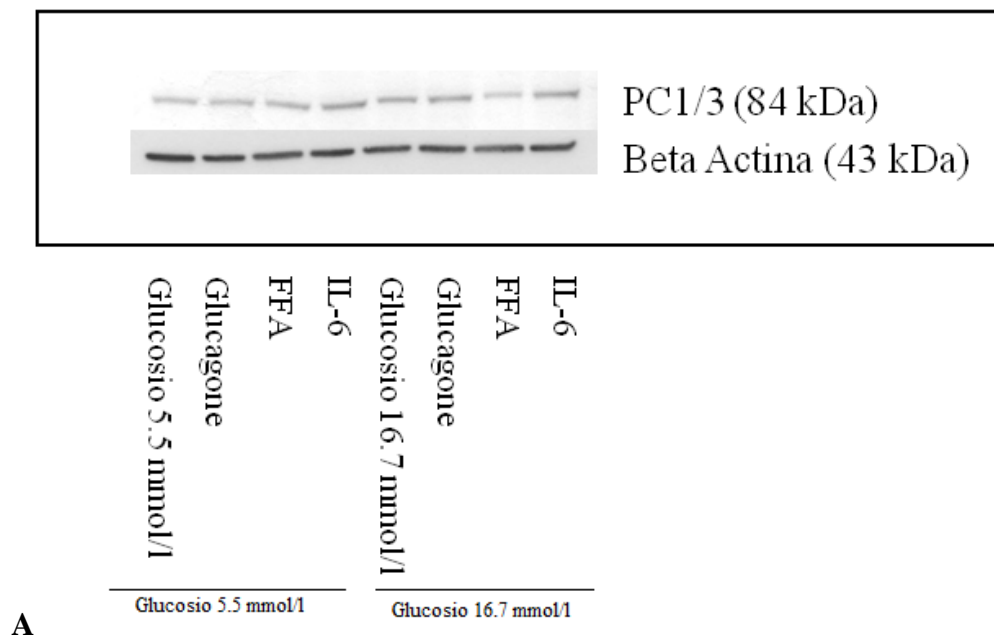
Il dato dell'espressione genica per PC1/3 e PC2, viene solo parzialmente riconfermato dallo studio dell'espressione proteica. Infatti, come riportato in **Figura 22A**, la proteina PC1/3 sembra essere modificata solo dalla presenza di un'elevata concentrazione di glucosio, mentre non sembra influire la presenza nel terreno di coltura di FFA, glucagone o IL-6 (\*= $p < 0.05$  vs glucosio 5.5 mmol/l). Invece, per quanto riguarda PC2, la presenza degli FFA induce una marcata riduzione dell'espressione proteica, sia a basso ( $71 \pm 7\%$ ) che ad alto ( $68 \pm 10\%$ ) glucosio, rispetto al controllo ( $100 \pm 0\%$ ) (\*= $p < 0.05$ ) (**Figura 22B**). In **Figura 23A** e **23B**, sono riportati degli esempi di corsa elettroforetica per la separazione delle proteine PC1/3 (**Figura 23A**) e PC2 (**Figura 23B**) con metodologia Western-Blot.



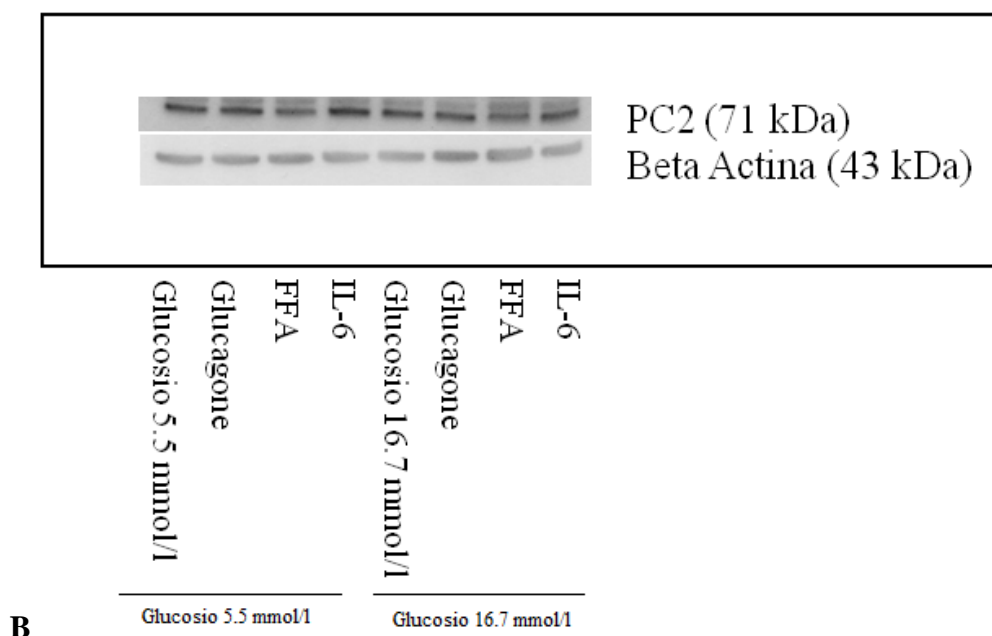


**Figura 22A-B.** Espressione proteica per PC1/3 (panello A) e PC2 (pannello B) in alfa cellule esposte per 16h a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, con o senza l'aggiunta nel terreno di coltura di una miscela di acidi grassi liberi (FFA, oleico:palmitico, 2:1) 0.5 mmol/l, glucagone 500 pg/ml o IL-6 200 ng/ml. Mentre solo il glucosio è in grado di modulare l'espressione proteica di PC1/3, gli FFA sono in grado di ridurre significativamente l'espressione proteica per PC2, sia a basso che alto glucosio (\*= $p < 0.05$  vs glucosio 5.5 mmol/l. Test-t di Student).

## PC1/3



## PC2



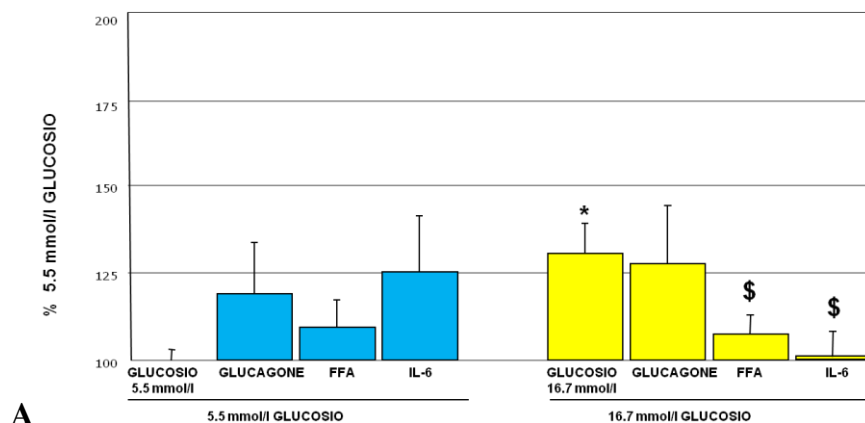
**Figura 23A-B.** Esempio di studi di espressione proteica per PC1/3 (pannello **A**) e PC2 (pannello **B**) con Western Blot su cellule esposte per 16h a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, con o senza l'aggiunta nel terreno di coltura di una miscela di acidi grassi liberi (FFA, oleico:palmitico, 2:1) 0.5 mmol/l, glucagone 500 pg/ml o IL-6 200 ng/ml.

### 4.3.6 Studi funzionali

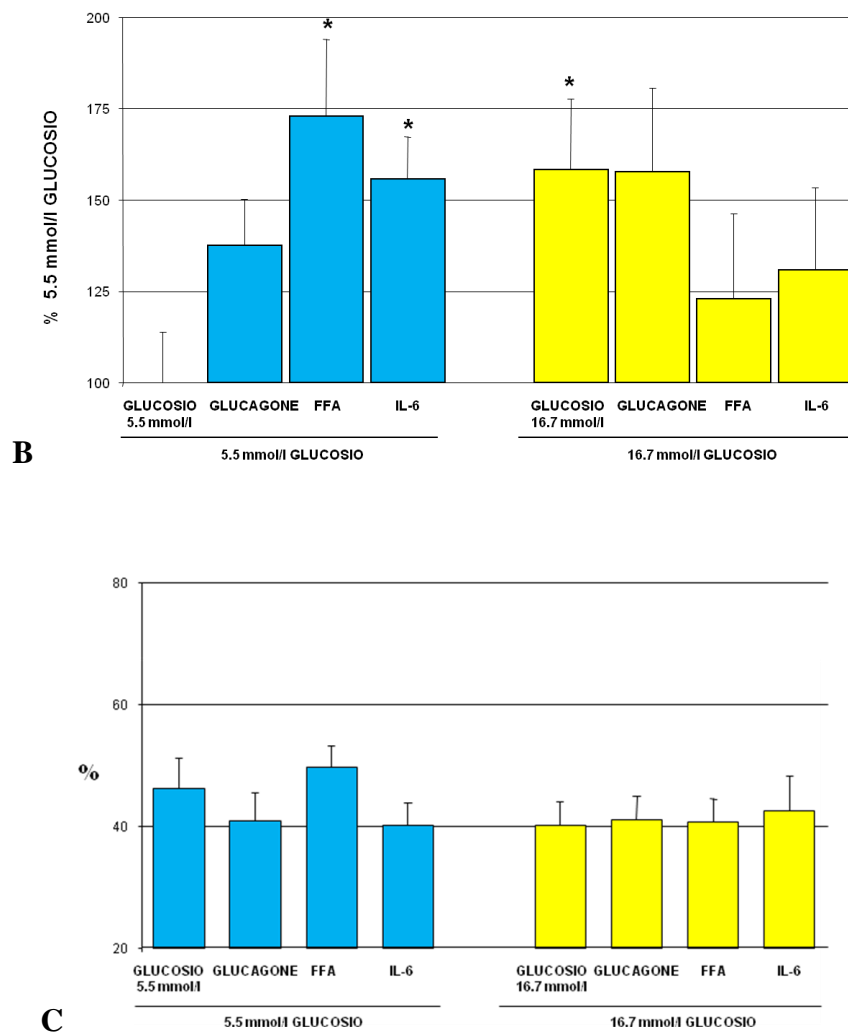
#### Secrezione di GLP-1 totale e attivo

16 h di coltura delle alfa cellule in presenza di glucosio 5.5 mmol/l e di una miscela di acidi grassi, glucagone o IL-6, non hanno determinato variazioni nel rilascio di GLP-1 totale nel terreno di coltura, come riportato in **Figura 24A**. Mentre l'esposizione per 16h a glucosio 16.7 mmol/l ha determinato un significativo aumento nella secrezione del GLP-1 totale ( $130 \pm 9\%$ ) rispetto al controllo (**Figura 24A**). Tuttavia, dai dati in nostro possesso, sembra che sia gli FFA ( $107 \pm 6\%$ ) che l'IL-6 ( $101 \pm 6\%$ ) siano in grado di ridurre significativamente la secrezione di GLP-1 quando le cellule sono coltivate in un terreno contenente glucosio 16.7 mmol/l, rispetto al glucosio 16.7 mmol/l da solo ( $130 \pm 9\%$ ) ( $p < 0.05$ )

(Figura 24A). I nostri dati sperimentali hanno poi evidenziato differenze significative nella secrezione della forma attiva del GLP-1: infatti, come riportato in Figura 24B, in alfa cellule coltivate in presenza di glucosio 5.5 mmol/l, con l'aggiunta di FFA ( $173\pm21\%$ ) o IL-6 ( $156\pm12\%$ ) viene indotto un aumento significativo del rilascio di GLP-1 attivo nel terreno di coltura, rispetto al controllo ( $100\pm14\%$ ) (tutto  $p<0.05$ ). Queste differenze vengono annullate in presenza di alto glucosio ed FFA o IL-6, ma con il solo glucosio 16.7 mmol/l si assiste ad un incremento significativo della secrezione di GLP-1 attivo ( $158\pm19\%$ ) rispetto al controllo. Dopo normalizzazione della secrezione della forma attiva per il valore totale dell'incetina rilasciata nel terreno di coltura, abbiamo osservato che le variazioni di secrezione del GLP-1, alle varie condizioni sperimentali, non sembrano essere associate ad un difetto di sintesi del peptide, ma al tipo di stimolo a cui sono esposte le alfa cellule (Figura 24C).



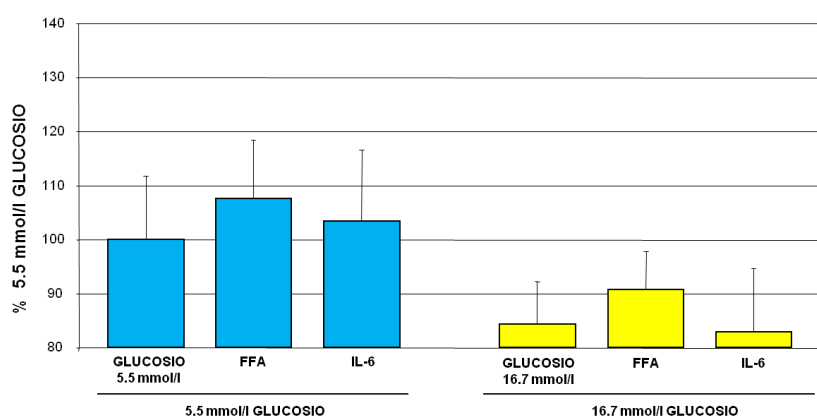




**Figura 24A-C.** Secrezione di GLP-1 totale (A), attivo (B) e rapporto fra le due forme (C). Rispetto ai controlli, la secrezione della forma totale si riduce significativamente in cellule trattate per 16h con FFA o IL-6 e stimulate con glucosio 16.7 mmol/l. (\*= $p < 0.05$  vs glucosio 5.5 mmol/l . \$= $p < 0.05$  vs glucosio 16.7 mmol/l. Test-t di Student). Il rapporto indicava una modulazione della secrezione stimolo-dipendente.

## Secrezione del glucagone

Per quanto riguarda la secrezione del glucagone, alle nostre condizioni sperimentali non si sono osservate differenze significative nel rilascio dell'ormone nel terreno di coltura di alfa cellule esposte per 16h a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, con o senza l'aggiunta di FFA 0.5 mmol/l o IL-6 200 ng/ml (**Figura 25**).



**Figura 25.** Secrezione di glucagone nel terreno di coltura di alfa cellule esposte a FFA 0.5 mmol/l o IL-6 200 ng/ml. Dopo 16h, non si sono osservate differenze significative della concentrazione dell'ormone in alfa cellule stimulate con FFA o IL-6, rispetto al controllo.

## **Capitolo 5. Discussione dei risultati**

Come è noto, il diabete mellito è una sindrome eterogenea, comprendente varie forme cliniche, di cui le più frequenti sono il diabete tipo 1, caratterizzato da deficit più o meno totale di secrezione di insulina, dovuto alla distruzione autoimmune delle cellule beta delle isole di Langerhans, e, soprattutto, il diabete tipo 2, in cui sono presenti, oltre alla carenza di insulina, fenomeni di resistenza all'azione dell'ormone<sup>1-6</sup>. In questi ultimi anni sono stati fatti notevoli progressi nello studio e nella valutazione funzionale delle isole pancreatiche, che costituiscono non più dell'1-2% della massa pancreatica complessiva. Sono strutture che contengono vari tipi di cellule endocrine, di cui le più rappresentate sono le cellule beta producenti insulina (60-80%) e le cellule alfa producenti glucagone (20-30%). In questi ultimi anni i ricercatori hanno focalizzato la propria attenzione principalmente sullo studio delle cellule beta pancreatiche, andando a studiarne i meccanismi che regolano la sintesi e il rilascio dell'insulina, nonché la massa complessiva delle cellule stesse. Tuttavia, come descritto nel capitolo introduttivo, in letteratura sono presenti pochi studi riguardo al ruolo delle cellule alfa nella funzionalità insulare. Il glucagone, ormone prodotto dalle cellule alfa pancreatiche, è il risultato finale di una serie di modifiche a carico del proglucagone, che rappresenta il reale polipeptide derivante dalla trascrizione del gene corrispondente. L'azione di enzimi proteolitici con specificità tissutale porta, infatti, attraverso clivaggi successivi, dal proglucagone al glucagone nelle cellule alfa e al GLP-1 e GLP-2 nelle cellule L dell'intestino<sup>7-9</sup>. Recentemente, in studi condotti nel nostro laboratorio, è stata descritta la presenza di un sistema di produzione del GLP-1 nelle isole pancreatiche umane, che risiede nelle cellule alfa e potrebbe essere alterato nei pazienti con diabete mellito tipo 2<sup>12</sup>. In vivo, il GLP-1 stimola la secrezione insulinica, riduce o sopprime il rilascio di glucagone (che risulta inappropriatamente elevato nei pazienti diabetici di tipo 2) e incrementa la massa di cellule beta stimolando la rigenerazione delle cellule pancreatiche<sup>10,11</sup>. Inoltre, abbiamo recentemente dimostrato la presenza di un sistema di produzione delle incretine in una linea murina di alfa cellule pancreatiche, un effetto anti-apoptotico della stessa incretina ed un ruolo protettivo del GLP-1 in presenza di elevate concentrazioni di FFA. Proteggere sia

la cellula beta che quella alfa contro l'apoptosi può portare ad approcci terapeutici innovativi che potrebbero essere destinati a migliorare la massa delle isole e modulare la funzione delle cellule beta in presenza di perturbazioni metaboliche, fra le quali dobbiamo includere anche l'iperglucagonemia e l'infiammazione, presenti nei pazienti affetti da diabete mellito tipo 2. Proprio per questo motivo, lo scopo della mia tesi è stato quello di confermare la secrezione di GLP-1 da parte delle alfa cellule pancreatiche murine, il suo ruolo nel modulare l'attività metabolica e la funzionalità delle stesse in presenza o meno di perturbazioni metaboliche come iperglicemia e l'ipernefemia e studiare, per la prima volta, come l'iperglucagonemia e l'interleuchina-6 possano alterare, o meno, la sintesi e la produzione di questa incretina.

I risultati ottenuti nella prima parte del mio studio hanno confermato che le alfa cellule pancreatiche sono in grado di sintetizzare e secernere GLP-1 in modo glucosio-dipendente: questo ha un effetto protettivo sulle alfa cellule stesse, mediato da un aumento della concentrazione dell' incretina nel terreno di coltura ed evidenziato da un miglioramento dell'attività metabolica cellulare anche in presenza di un'elevata concentrazione di glucosio. L'iperglicemia induce la trascrizione di PC1/3 parallelamente ad un aumento della secrezione della forma attiva di GLP-1 che, come noto da numerosi studi presenti in letteratura, ha proprietà anti-apoptotiche.

Nella seconda parte dello studio, ho valutato il ruolo di perturbazioni metaboliche tipiche del diabete mellito tipo 2, come ipernefemia, iperglucagonemia e infiammazione.

Alle mie condizioni sperimentali, acidi grassi, glucagone e IL-6 determinano effetti differenti sulla sintesi e secrezione del GLP-1 e sulla funzionalità e attività metabolica delle alfa cellule pancreatiche. In particolare, sembra che l'esposizione cronica ad un'elevata concentrazione di FFA abbia effetto prevalentemente sull'attività metabolica cellulare, come confermato da una riduzione della stessa, un aumento del tasso di apoptosi, di necrosi e dello stress ossidativo. Da questo potremmo dedurre che tutte le alterazioni a livello funzionale possano essere secondarie a un aumento del numero di cellule che vanno incontro a morte, come spesso è stato osservato anche su altri modelli

cellulari esposti ad una miscela di acidi grassi liberi. Ruolo differente sembra averlo sia il glucagone che l'IL-6.

E' comprensibile come dalla scoperta dell'insulina nel 1922, tutte le attenzioni siano state rivolte allo studio del ruolo di quest'ormone che, tuttavia, da solo non è in grado di controllare l'omeostasi del glucosio. Anche se negli ultimi anni è stato evidenziato il ruolo diabetogenico del glucagone, non sono stati fatti ancora sufficienti sforzi per comprenderne il meccanismo d'azione<sup>182</sup>. E' stato dimostrato che il glucagone aumenta la produzione epatica sia di glucosio che di corpi chetonici, entrambi presenti in eccesso nel diabete, e che una distruzione delle beta cellule non determina la comparsa di diabete in topi privi di recettore per il glucagone<sup>183</sup>. Inoltre, è stata ampiamente dimostrata la presenza di iperglucagonemia nella maggior parte dei casi di diabete mellito<sup>21</sup>. Tuttavia, i nostri dati sperimentali non sembrano attribuire al glucagone particolari effetti per quanto riguarda l'attività metabolica e la funzionalità delle alfa cellule pancreatiche, in particolare per quello che concerne il ruolo diretto o indiretto di una variazione della secrezione di GLP-1. Infatti, la presenza di un'elevata concentrazione di glucagone nel terreno di coltura, induce solamente un aumento della trascrizione genica dell'enzima PC1/3 che, tuttavia, non sembra essere associata ad un aumento della traduzione proteica.

Per quanto riguarda il ruolo dell'interleuchina, è stato dimostrato che una somministrazione di IL-6, o elevate concentrazioni di IL-6 circolanti in risposta all'esercizio fisico, sono in grado di stimolare la secrezione di GLP-1 dalle cellule L intestinali attraverso un aumento della sintesi di proglucagone e di PC1/3, migliorando sia la secrezione di insulina che la glicemia<sup>184</sup>. I dati riportati in

---

<sup>182</sup>Unger RH, Cherrington AD. Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover. *J Clin Invest.* 2012 Jan 3;122(1):4-12.

<sup>183</sup>Lee Y, Berglund ED, Wang MY, Fu X, Yu X, Charron MJ, Burgess SC, Unger RH. Metabolic manifestations of insulin deficiency do not occur without glucagon action. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Sep 11;109(37):14972-6. doi: 10.1073/pnas.1205983109. Epub 2012 Aug 13. PubMed PMID: 22891336; PubMed Central PMCID: PMC3443167.

<sup>184</sup>Ellingsgaard H, Hauselmann I, Schuler B, Habib AM, Baggio LL, Meier DT, Eppler E, Bouzakri K, Wueest S, Muller YD, Hansen AM, Reinecke M, Konrad D, Gassmann M, Reimann F, Halban PA, Gromada J, Drucker DJ, Gribble FM, Ehses JA, Donath MY. Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells. *Nat Med.* 2011 Oct 30;17(11):1481-9.

questa tesi rafforzano il ruolo di questa interleuchina nella patologia diabetica. Infatti, quello che abbiamo osservato è un aumento dell'espressione genica dell'enzima PC1/3 associato a un incremento della sintesi di GLP-1 attivo nel terreno di coltura delle alfa cellule esposte a un'elevata concentrazione di IL-6, in particolare associato ad un'elevata concentrazione di glucosio. Questo effetto si ripercuote in un miglioramento dell'attività metabolica cellulare.

Poiché il diabete di tipo 2 è associato con iperglicemia, iperlipidemia, iper glucagonemia e infiammazione, molti studi sono stati effettuati in questi ultimi anni sul ruolo negativo che queste perturbazioni metaboliche potrebbero esercitare sull'attività metabolica e sulla funzionalità delle isole pancreatiche, in particolare per quel che riguarda la beta cellula. Infatti, vi è ampia evidenza che gli acidi grassi, che in circostanze normali sono i carburanti fisiologici per la beta cellula, diventano tossici se presenti in concentrazioni elevate per lunghi periodi di tempo<sup>185</sup>. Effetti negativi dell'esposizione cronica della beta cellula a elevate concentrazioni di acidi grassi sono una ridotta secrezione dell'insulina indotta dal glucosio<sup>186,187,188,189</sup>, un'alterata espressione genica dell'insulina<sup>190,191,192</sup>, e un aumento della morte cellulare<sup>193,194,195</sup>. Alcuni studi hanno dimostrato che il GLP-

---

<sup>185</sup>McGarry JD, Dobbins RL: Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia* 42:128–138,1999

<sup>186</sup>Sako Y, Grill VE: A 48-hour lipid infusion in the rat time-dependently inhibits glucose-induced insulin secretion and B cell oxidation through a process likely coupled to fatty acid oxidation. *Endocrinology* 127 :1580 –1589,1990;Elks ML

<sup>187</sup>Zhou YP, Grill VE: Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. *J Clin Invest* 93 :870 –876,1994

<sup>188</sup>Zhou YP, Grill V: Long term exposure to fatty acids and ketones inhibits B-cell functions in human pancreatic islets of Langerhans. *J Clin Endocrinol Metab* 80 :1584 –1590,1995

<sup>189</sup>Paolisso G, Gambardella A, Amato L, Tortoriello R, D'Amore A, Varricchio M, D'Onofrio F: Opposite effects of short- and long-term fatty acid infusion on insulin secretion in healthy subjects. *Diabetologia* 38 :1295 –1299,1995

<sup>190</sup>Gremlich S, Bonny C, Waeber G, Thorens B: Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels. *J Biol Chem* 272 :30261 –30269,1997

<sup>191</sup>Ritz-Laser B, Meda P, Constant I, Klages N, Charollais A, Morales A, Magnan C, Ktorza A, Philippe J: Glucose-induced preproinsulin gene expression is inhibited by the free fatty acid palmitate. *Endocrinology* 140 :4005 –4014,1999

<sup>192</sup>Jacqueminet S, Briaud I, Rouault C, Reach G, Poitout V: Inhibition of insulin gene expression by long-term exposure of pancreatic  $\beta$ -cells to palmitate is dependent on the presence of a stimulatory glucose concentration. *Metabolism* 49 :532 –536,2000

<sup>193</sup>Milburn JL Jr, Hirose H, Lee YH, Nagasawa Y, Ogawa A, Ohneda M, BeltrandelRio H, Newgard CB, Johnson JH, Unger RH: Pancreatic  $\beta$ -cells in obesity: evidence for induction of

1, prodotto dalle cellule L intestinali, sembra essere in grado di ridurre gli effetti tossici, nella beta cellula, della lipotossicità indotta dalla presenza di elevate concentrazioni di acidi grassi liberi. Tuttavia, i meccanismi alla base di questo fenomeno non sono del tutto noti.

Gli studi preliminari presentati in questa tesi hanno confermato la presenza di un sistema di produzione delle incretine nelle alfa cellule pancreatiche e potrebbero suggerire che la lipotossicità sia in grado di ridurre la funzionalità, l'attività metabolica e la massa beta cellulare alterando la secrezione di GLP-1 nelle alfa cellule, mentre l'IL-6 induce la produzione dell'incrétina migliorando l'attività metabolica dell'alfa cellula pancreatica. Inoltre, i nostri dati rafforzano l'ipotesi di una proprietà anti-apoptotica del GLP-1: proteggere sia la cellula beta che quella alfa contro l'apoptosi può portare ad approcci terapeutici innovativi che sono destinati a migliorare la massa delle isole e proteggere la funzione delle cellule beta in presenza delle perturbazioni metaboliche tipiche del diabete mellito tipo 2. Infine, l'IL-6 sembra mediare l'interazione fra tessuti insulino-sensibili e la produzione di GLP-1: questo potrebbe suggerire un ruolo di questa interleuchina nella regolazione della secrezione di insulina e indicare che i farmaci che modulano questo meccanismo potrebbero essere utili nella cura del diabete mellito tipo 2.

---

functional, morphologic, and metabolic abnormalities by increased long chain fatty acids. J Biol Chem 270 :1295 –1299,1995

<sup>194</sup>Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, Unger RH: Fatty acid-induced  $\beta$ -cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. Proc Natl Acad Sci U S A 95 :2498 –2502,1998

<sup>195</sup>Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY: Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on  $\beta$ -cell turnover and function. Diabetes 50 :69 – 76,2001.

## **Ringraziamenti.**

Ringrazio profondamente il Dott. Roberto Lupi e la Dott.ssa Veronica Sancho Bornez per i preziosi insegnamenti ricevuti, per i tanti consigli, per il costante supporto e per il tempo dedicatomi.

Ringrazio tutto il personale del laboratorio per avermi accolta con gentilezza, disponibilità e sempre con un sorriso. Un grazie particolare va alle mie colleghe, amiche e compagne d'avventura, Dalila, Erica e Paola per i bei momenti passati insieme, per il sostegno e l'aiuto morale di ogni giorno.

Ringrazio i Correlatori, Prof.ssa Luciana Dente e Prof. Aldo Paolicchi e tutti i Professori del Corso di Laurea per aver contribuito alla mia formazione.

Ringrazio la mia famiglia che mi ha permesso di realizzare tutto questo sostenendomi e credendo in me senza riserve.

Ringrazio Andrea, che con la sua presenza discreta e affettuosa mi è stato sempre accanto aiutandomi nei momenti difficili con estrema pazienza e amore.

Valentina